

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931-1932.

N° 9.

Contribution à l'étude
botanique, chimique et physiologique
du KAÁ HÊ-Ê.

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1932

PAR

R. LAVIEILLE,

PHARMACIEN

JURY { MM. BOUGAULT, Président.
HÉRISSEY, Professeur.
FLEURY, Agrégé.



LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1932

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931-1932.

N° 9.

Contribution à l'étude
botanique, chimique et physiologique
du KAÁ HÊ-Ê.

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le 1932

PAR

R. LAVIEILLE,

PHARMACIEN



JURY { MM. BOUGAULT, Président.
HÉRISSEY, Professeur.
FLEURY, Agrégé.



LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1932

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, Doyen, O. *, ☉ I.

LEBEAU, Assesseur, O. *, ☉ I.

G. DURENT, Secrétaire, *, ☉ I.

PROFESSEURS

GUÉRIN, *, ☉ I.....	Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut,	
G. O. *, ☉ I.....	Chimie organique.
PERROT, O. *, ☉ I.....	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. *, ☉ I.....	Zoologie.
LEBEAU, O. *, ☉ I.....	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, *, ☉ I.....	Chimie analytique.
GORIS, *, ☉ I.....	Pharmacie galénique.
TASSILLY, *, ☉ I.....	Physique.
DAMIENS, *, ☉ I.....	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. *, ☉ I.....	Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☉ I.....	Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, *, ☉ I.....	Cryptogamie et Micro- biologie.
FABRE, ☉ I.....	Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☉ I.....	Professeur sans chaire.

Professeurs honoraires : MM. A. VILLIERS, *, ☉ I., DELÉPINE, O. *, ☉ I.,
RADAIS, O. *, ☉ I et GUERBET, *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, *, ☉ I....	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. *, ☉ I.....	Pharmacodynamie.
DELABY, *, ☉ I.....	Minéralogie.
BACH, ☉ I.....	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY *, ☉ I.	MM MASCRÉ, ☉ I.	MM. BEDEL, ☉ I.
PICON, ☉ I.	FLEURY, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
	BACH, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., <i>agrégé</i> , chargé des T. P de 1 ^{re} année.....	Chimie générale.
FLEURY, ☉ I, et RÉGNIER, ☉ I, <i>agrégés</i> , chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.....	Micrographie
LEROUX, ☉ I.....	Physique.
DEVAL, ☉ I.....	Microbiologie.
DELABY, *, ☉ I, PICON, ☉ I, et MASCRÉ, ☉ I. <i>agrégés</i> , chargés des Travaux généraux de 4 ^e année.	

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☉ I.



A LA MÉMOIRE DE MON REGRETTÉ MAÎTRE

LE PROFESSEUR BRIDEL,

PROFESSEUR AU MUSÉUM D'HISTOIRE NATURELLE,
PHARMACIEN-CHEF DE L'HÔPITAL LARIBOISIÈRE,
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOUGAULT,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,
PHARMACIEN-CHEF DE L'HÔPITAL DE LA CHARITÉ,
CHEVALIER DE LA LÉGIION D'HONNEUR.

Hommage de respect et de gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HÉRISSEY,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,
PHARMACIEN CHEF DE L'HÔPITAL SAINT-ANTOINE,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MES PARENTS

*Témoignage de vive affection et de profonde
reconnaissance.*

AVANT PROPOS.

Cette étude a été effectuée au Laboratoire de Physique Végétale du Muséum National d'Histoire Naturelle, sous la direction de M. le Professeur BRIDEL.

Un destin cruel ne lui a pas permis d'assister à la soutenance de cette thèse qui lui doit tant dans le fonds et dans la forme. Les deux années passées à ses côtés, dans son laboratoire où j'avais reçu un si aimable accueil, me permirent d'apprécier toutes les hautes qualités de ce Maître. Chercheur passionné, travailleur infatigable, d'une bonté qui n'avait d'égale que sa modestie, il ne tardait pas à se faire apprécier et aimer de ses élèves.

En ce qui me concerne, je ne saurais trop dire combien j'ai été touché de l'intérêt qu'il m'a constamment témoigné, de l'appui et des encouragements continuels qu'il m'a donnés au cours de ces recherches. J'ai largement mis à contribution son extrême bienveillance dans les conseils quotidiens que j'ai sollicités de lui ; aussi je me fais aujourd'hui un devoir d'adresser ici un hommage de profonde reconnaissance à la mémoire de mon Maître regretté.

De ce Professeur aimable et aimé je conserverai toujours un souvenir ému.

Avec sa compétence reconnue et sa grande amabilité M. le Docteur MAHEU, Chef de Laboratoire de la Faculté de Pharmacie, a bien voulu me guider dans

l'étude morphologique du *Stevia Rebaudiana* : je lui adresse mes respectueux remerciements et l'assure de toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à cette étude.

Mes remerciements vont également à M. le Docteur POMARET, ancien Chef de Laboratoire de l'Hôpital Saint-Louis, envers lequel j'ai une double dette de reconnaissance. C'est lui, qui, à la suite d'une rencontre tout à fait fortuite, me proposa le sujet de ce travail qu'il avait eu d'ailleurs, primitivement, l'intention de traiter. Par la suite, toujours avec autant d'amabilité et d'empressement, il se chargea de me procurer la matière première en quantité suffisante. Enfin, il a bien voulu entreprendre avec moi l'étude de quelques propriétés « in vivo » du Stévioside. Je l'assure ici de mes sincères remerciements et de mon entier dévouement.

Je tiens à exprimer à M. le Professeur BOUGAULT ma très vive reconnaissance pour l'aimable accueil qu'il m'a réservé et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A M. le Professeur HÉRISSEY et à M. le Professeur agrégé FLEURY qui ont bien voulu accepter d'être membres de ce jury, j'exprime ma profonde gratitude.

Enfin, je n'aurais garde de terminer ces quelques lignes sans remercier mon camarade RABATÉ, sous-directeur du Laboratoire de Physique Végétale de ses judicieux conseils et de sa si cordiale et bienveillante sympathie.

INTRODUCTION.

Historique.

Le Kaá hê-é (*Stevia Rebaudiana* BERTONI ; Composées) est une plante spontanée, originaire du Paraguay. Ce nom, ainsi que ceux « d'Azuca-cà-a et d'Eira cà-a » sous lesquels on la désigne encore dans ce pays, lui viennent de sa saveur sucrée remarquable et signifient en langue guarani : « herbe sucrée, herbe mielleuse ». C'est d'ailleurs sous le nom « d'herbe sucrée du Paraguay » qu'elle a été et est encore désignée quelquefois en Europe.

Cette plante ne paraît pas avoir été très anciennement connue. Son existence fut en effet signalée pour la première fois en 1887 ; les quelques renseignements recueillis, provenant alors d'indiens et de baqueanos indigènes étaient d'ailleurs très vagues, et ce n'est que quelques années plus tard que le D^r M. BERTONI, savant botaniste du Paraguay put avoir la certitude de l'existence de cette plante et de ses propriétés édulcorantes. Il s'agissait d'une plante rare, juste connue à cette époque de quelques yerbateros du Nord Est. Les indiens, disaient-ils, mélangent en petite proportion les feuilles réduites en menus fragments à l'Yerba Maté afin de rendre plus agréable

cette boisson naturellement amère ; ils lui attribuent en outre la réputation d'une véritable panacée et même des propriétés curatives dans la lèpre et la syphilis.

Malheureusement le Kaá hê-é poussait dans la campo, région septentrionale du Paraguay, à peu près déserte, et où les communications, par suite du manque de voies de pénétration, étaient et sont encore de nos jours très difficiles. Cet état de choses devait sérieusement entraver l'étude de la drogue.

En 1899 le D^r BERTONI arriva à se procurer quelques fragments de tiges et de feuilles, ainsi que des restes d'inflorescences ; mais, malgré toutes les supplications et offres de prix, il fut obligé d'attendre jusqu'en 1904 pour pouvoir s'en procurer un échantillon complet par l'intermédiaire du R. P. LORENZO A. ESTIGARRIBIA, curé de SAN PEDRO. Il put alors en faire une description exacte.

Dès 1899, le D^r BERTONI [4] reconnut cependant qu'il s'agissait d'une espèce nouvelle et la décrivit sous le nom d'*Eupatorium Rebaudianum* sp. n.

En 1905, donnant la description d'une plante qu'il avait cultivée [5] il montre qu'elle n'appartient pas au genre *Eupatorium*, mais au genre *Stevia*. Elle possède en effet, quelques rapports avec des plantes de ce genre : *Stevia polycephala*, BACKER, *S. Collina*, GARD, et *S. veronicae* D. C. Il décrit alors en détails le Kaá hê-é sous le nom de *Stevia Rebaudiana* BERTONI, nom sous lequel on le désigne maintenant. Un an plus tard, HEMSLEY, dans le *Hooker's Icones plantarum* décrit la plante et la classe à son tour dans le genre *Stevia* [17].

La saveur extraordinairement sucrée du *Stevia Rebaudiana* devait attirer rapidement l'attention des chercheurs ; il était en effet intéressant d'essayer d'élucider la composition chimique de cette plante, de savoir à quel principe pouvait être dû son énorme pouvoir édulcorant.

La première étude chimique fut entreprise par OVIDIO REBAUDI, en 1900, sur un échantillon que lui avait remis BERTONI. Puis en 1908, RASENACK s'étant procuré quelques kgs. de drogue par l'intermédiaire du consul allemand à Assomption, en entreprit également l'étude. Après de longs tâtonnements, il réussit le premier à isoler un produit cristallisé, à pouvoir sucrant énorme ; mais, ne disposant que d'une quantité insuffisante de ce produit, il ne pût en approfondir l'étude.

Presque en même temps, KARL DIETERICH, directeur du laboratoire d' Helfenberg, retrouvait le corps cristallisé signalé par RASENACK ; il mentionnait en outre l'existence d'un deuxième corps qu'il n'avait pû, malgré plus d'un an d'efforts, obtenir cristallisé.

Ce sont là, à notre connaissance, les seuls travaux ayant été effectués sur le Kaá hê-é ; par la suite, parurent de nombreuses notes dans les *Nouveaux Remèdes* [20], le *Kew Bulletin* [11] ; les *Annales de la Droque* [1], le *Bull. soc. nat. Accl.* [12], la *Revue internationale des renseignements agricoles* [24] etc..., mais toutes ne sont que des résumés des travaux des auteurs précédents et n'apportent aucun renseignement nouveau sur le *Stevia Rebaudiana*.

Comme on le voit par ce bref historique, si la plante, au point de vue botanique, avait été minutieusement décrite par le D^r BERTONI, la constitution chimique n'était encore qu'ébauchée. Il nous a donc paru intéressant de reprendre l'étude du Kaá hê-é au point de vue de la description anatomique de la plante, ce qui n'avait pas été fait jusque-là, puis surtout au point de vue de la composition chimique.

Les premiers essais que nous avons effectués au laboratoire ont été fait sur un kg. de plante qui nous a été remis par M. le D^r POMARET. C'est également par son intermédiaire que M. CARLOS SOSA, ancien sous-secrétaire d'Etat de la République du Paraguay, nous a expédié une quantité importante de Kaá hê-é qui nous est parvenu en parfait état de conservation. Je suis heureux de remercier tout particulièrement M. CARLOS SOSA pour ce généreux envoi. Je n'ignore pas les nombreuses difficultés matérielles auxquelles il s'est heurté : il a été en effet obligé, pour récolter une telle quantité de drogue, de mettre sur pied une véritable expédition en zone tropicale. Devant un tel désintéressement, je ne puis qu'assurer M. CARLOS SOSA de ma plus vive gratitude pour m'avoir fourni les matériaux indispensables à l'étude qui fait l'objet de cette thèse.

Ce travail se divise de la façon suivante :

La première partie est consacrée à l'étude botanique du Kaá hê-é. En ce qui concerne la partie systématique, il nous a paru bon de rappeler, pour cette plante peu connue en Europe, la description qu'en a fait en latin le botaniste BERTONI. Au point de vue morpho-

logie, nous avons voulu voir si la plante ne présente pas quelque particularité. Nous avons étudié la feuille et la tige de *Stevia Rebaudiana*, soit sèches, soit à l'état frais, un pied de *St. R.* existant dans les serres du Muséum d'Histoire Naturelle.

La deuxième partie, comprend l'étude du principe sucré du Kaá- hè-é et se divise ainsi :

1. Résumé des travaux antérieurs.
2. Essais de caractérisation d'un glucoside dans les feuilles et dans les tiges du *Stevia Rebaudiana*, par la méthode biochimique, puis par hydrolyse acide.
3. Extraction du glucoside (Stévioside).
4. Existence d'un seul glucoside sucré dans la plante, la rebaudine de DIETERICH n'étant que du stévioside impur.
5. Etude des propriétés physiques et chimiques de ce glucoside.
6. Hydrolyse fermentaire du stévioside ; produits d'hydrolyse diastasique et d'hydrolyse acide.
7. Formule du stévioside.

KOBERT, ayant en 1915, fait entrer les corps isolés par DIETERICH dans la catégorie des saponines, nous avons été amenés dans la **Troisième partie** à étudier l'action physiologique du Stévioside retiré du Kaá hè-é.

Le travail se termine par les principales conclusions dégagées de nos recherches.



Stevia Rebaudiana BERTONI (Composées).
(pied cultivé dans les serres du Muséum d'Histoire Naturelle)

PREMIÈRE PARTIE.

Etude Botanique du *Stevia Rebaudiana* Bertoni,

A. — Etude systématique.

Stevia Rebaudiana BERTONI.

Synonyme : *Eupatorium Rebaudianum* BERTONI

Famille : Composées. Eupatoriées.

Noms indigènes ; Kaá hê-é ; azuca cãa ; eira cãa.

Le genre *Stevia*, appartient à la famille des Composées. Il compte environ 80 plantes, herbacées ou sous frutescentes, annuelles ou vivaces, toutes américaines. Créé par CAVANILLÈS [13] et voisin des genres *Ageratum* et *Eupatorium*, il se distingue dans le groupe des Ageratées par des capitules 5-flores, disposés en cymes terminales souvent corymbiformes, par l'involucre formé de 5-6 bractées (6 à ∞ dans les *Ageratum* et les *Eupatorium*). Le fruit aussi est surmonté de paillettes (pappus) toutes où en partie aristées et dont le nombre peut varier de 5 à 20 alors que chez les *Eupatorium* et les genres voisins, le pap-

pus est formé d'un fin chevelu ou de soies un peu rigides ou plumeuses, en nombre très variable ($2-\infty$), Quelques espèces du Genre *Stevia* sont cultivées pour l'odeur anisée de leurs feuilles [2-3-15].

Le *Stevia Rebaudiana* BERTONI, petite plante originaire du campo paraguayen, se rencontre sur les hauts plateaux du Nord, depuis la région de l'Amambañi jusqu'aux sources du Rio Monday (environ 55° W et 25°30'S) principalement dans les prairies de San Pedro, Alto Jejuy, Vaca-rétá et Ihu. On le trouve près des marécages, poussant dans des terres noires, toujours disséminé sous forme de touffes.

Ne dépassant pas quelques décimètres de haut, cette plante herbacée, à racines vivaces, possède une tige annuelle assez grêle, un peu ramifiée au sommet en panicules assez grands mais peu fournis, formés de petits corymbes de 2 à 6 fleurs. Celles-ci, petites, à corolle blanche, tubuleuse, sont réunies en capitules homogames. Les feuilles oblongues, sont petites et étroites. Leur plus grande largeur se trouve vers la moitié de leur partie supérieure. Le limbe, crenelé vers l'extrémité supérieure, est entier vers le milieu et la partie inférieure qui est cunéiforme. Il est légèrement pubescent sur les deux faces et soutenu par un pétiole très court. Les feuilles, ordinairement opposées, peuvent être quelques fois alternes sur le même pied. Voici la minutieuse description latine qu'a donné BERTONI de cette plante :

Stevia species succo dulcissimo facta, foliis oppositis interdum alternis fere sessilibus dimidio superiore crenatis anguste oblongis basi cuneatis utrinque pilosis trinervatis, floribus exsertis, involucris squamis dorso dense puberulis, pappo 15-aristato setis dense ciliatis.

Planta perennis, alt. 0,40-0,80 m., *caule* annuo gracile erecto pubescente, usque ad apicem laxè corymboso-paniculato internodiis 2-5 cm. longis. *Folia* erecto-patentia 4-6 cm. longa, supra medium 8-13 mm. lata, plana obtusa, dimidio superiore vel ad apicem tantum crenata, medio et usque ad basin integra, utrinque viridia, trinervata, utrinque pilis sat numerosis adpressis praedita, petiolo brevissimo 1-3 mm. longo. *Panicula* ampla laxa dense puberula, ramis ascendentibus lateralibusque erecto-patentibus, corymbis numerosis non rare paucifloribus, pedicellis gracilibus brevissimis 1-2 mm. longis, bracteis lanceolato-linearibus obtusis. *Involucrum* 8-10 mm. longum, squamis viridibus acutis denseque extus pilosis. *Corolla* pallida, tubo tenui pappo aequilongo vel magis elongato inferne viridiusculo superne pallide sordideque purpurascente intus piloso extus fere nudo, lobis ovato-lanceolatis subacutis 1 1/2-2 mm. longis albis conspicue ciliatis flore expanso patentibus. Styli rami longitudinem corollae loborum duplo superantes recurvo-patentes dense breviterque puberuli. *Achaenia* fere glabra parum ad costa ciliolata 2 1/2 mm. longa. *Pappus* stramineus 3-4 mm. longus, setis 15 subacqualibus rigidis barbellatis nonnullis achaeniorum nonnullorum 1/2 vel 1/2 brevioribus, barbellis rigidis linearibus-lanceolatis erectis, prope basin setae numerosissimis deinde per setam usque ad apicem sparsis.

Species *S. collinae* GARDN et aliis certe plus minus affinis, sed foliis peninerviis stricti utrinque pilosis interdum alternis, corollae lobis ovato-lanceolatis tiboque tenui elongato intus piloso, styli ramis elongatis, achaeniis fere glabris et succo dulcissimo, facillime distinguitur [5].

B. — **Morphologie interne des parties étudiées
au point de vue chimique.**

1° **TIGE** (Fig. I).

La tige est de forme arrondie.

Elle est recouverte par un épiderme constitué de cellules ovoïdes, à cuticule un peu subérifiée et denticulée. Cet épiderme porte des poils sécréteurs pluricellulaires, unisériés, formés de 4 à 5 cellules ovoïdes dont la dernière est allongée en pointe aigue. Les parois en sont légèrement subérifiées.

Le parenchyme cortical est collenchymateux dans sa partie externe, sa partie profonde étant formée de cellules un peu allongées tangentiellement. L'endoderme, très net, montre de chaque côté des faisceaux un petit canal sécréteur. Celui-ci, de forme losangique est bordé par quatre cellules dont deux appartiennent à l'endoderme et deux au parenchyme cortical. Le péricycle est entièrement sclérifié. Non seulement il forme une zone en demi-lune, comme cela s'observe dans la plupart des Tubuliflores, mais il se prolonge entre les faisceaux en piliers sclérifiés très larges. Toutes ces zones sont constituées par de petites fibres hexagonales à parois épaissies et à lumen punctiforme. Le liber forme des amas ovoïdes, légèrement aplatis à la face supérieure. Il est constitué par un tissu à éléments très réduits où les tubes criblés sont peu différenciés du parenchyme. On y distingue de nombreuses cellules plus larges et arrondies.

Les faisceaux du bois sont en forme de cône ; les vaisseaux, à parois minces, sont réunis par un paren-

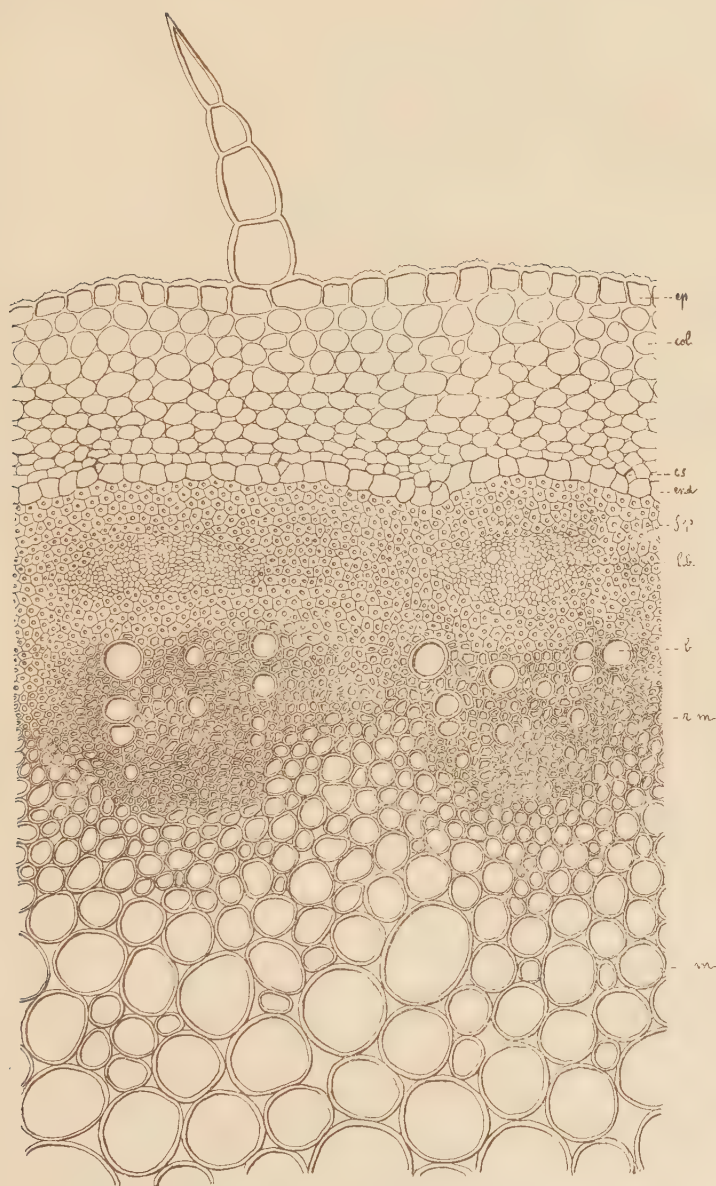


FIG. I. — Coupe transversale de tige de *Stevia Rebaudiana*.
(Grossissement : 170 d)

ép. : épiderme ; coll. : collenchyme ; cs. : canal sécréteur ;
fp. : fibres péricycliques ; lib. : liber ; b. : bois ; rm. :
rayons médullaires ; m. : moelle.

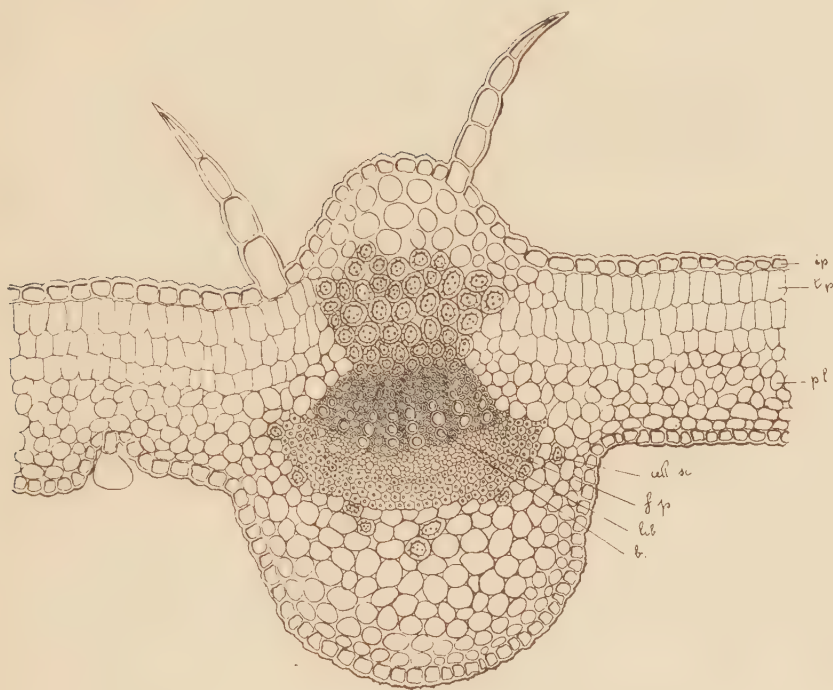


FIG. II. — Coupe transversale. Nervure médiane (Gross. : 110 d).

tp. : Tissu pallisadique ; *pl.* : parenchyme lacuneux ; *cell. sc.* : cellule scléreuse ; *l.* : liber ; *fp.* : fibres péricycliques ; *b.* : bois.

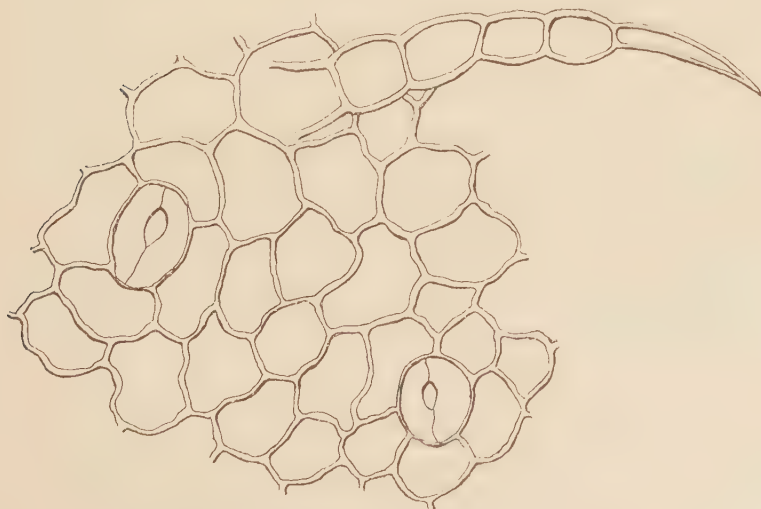


FIG. III. — Epiderme supérieur (vu de face).
(Gross. : 230 d)

chyme ligneux lignifié : la région externe est formée de fibres analogues à celles de la région péricyclique, la région interne, de cellules à parois légèrement épaissies et subérifiées.

Tous les faisceaux libéro-ligneux sont isolés par de larges rayons médullaires à cellules arrondies et lignifiées. La moelle, abondante, est également constituée par de très grandes cellules rondes, imprégnées de subérine.

Nous n'avons constaté dans nos coupes aucune forme cristalline d'oxalate de chaux.

2° FEUILLE.

Nous avons étudié dans la feuille successivement la nervure médiane et le limbe.

a) **Nervure médiane** (fig. II).

La nervure médiane est biconvexe sur ses deux faces.

La face supérieure présente une crête couverte d'un épiderme à cellules cubiques protégées par une cuticule denticulée et subérifiée. La face inférieure est limitée par un épiderme identique, mais à éléments plus réduits.

En dessous de chaque épiderme se trouve une zone de collenchyme à éléments arrondis. Enfin au centre d'un parenchyme formé de cellules rondes se trouve le faisceau libéro-ligneux, conique, en arc très redressé. Il est constitué par une zone de vaisseaux disposés en files radiales et réunis par un parenchyme ligneux lignifié. Ce bois est surmonté d'un arc libérien étroit formé de parenchyme présentant des

ilots de tissu criblé. Il est protégé dans la région péri-cyclique par une zone de sclérenchyme constitué par de petites fibres hexagonales, à parois épaisses et à lumen punctiforme. Au voisinage de cet arc scléreux, on constate quelques rares cellules scléreuses, arrondies, à parois épaissies et ponctuées. Ces cellules se retrouvent également au-dessus du bois : d'abord de petit diamètre, elles augmentent ensuite et disparaissent au début du collenchyme.

Pas de cristaux d'oxalate de Ca dans les tissus de cette nervure médiane.

b) **Limbe.**

Le limbe est aplati à la face supérieure et présente une sorte d'ondulation de la face inférieure. Cette ondulation est due à des cryptes qui renferment chacune un poil sécréteur.

Examiné de face (fig. III), l'épiderme supérieur est formé de cellules à parois ondulées, un peu épaissies ; il montre des stomates ovoïdes, entourés de quatre cellules de bordure dont deux parallèles à l'ostiole. La cuticule est lisse. Il porte des poils tecteurs allongés, unisériés, formés de 4 à 5 cellules ovoïdes, la dernière plus allongée se terminant en pointe. Les cellules de ces poils à éléments « boudinés » ont leurs parois légèrement épaissies et subérifiées.

Rares poils sécréteurs unicellulaires.

L'épiderme inférieur, examiné de face (fig. IV), est formé de cellules à parois ondulées et fines. Les stomates ovoïdes, nombreux, sont entourés de quatre cellules annexes sensiblement identiques. Les deux cellules parallèles à l'ostiole ont leur cuticule fine-



FIG. IV. — Epiderme inférieur (vu de face).
(Gross. : 340 d).

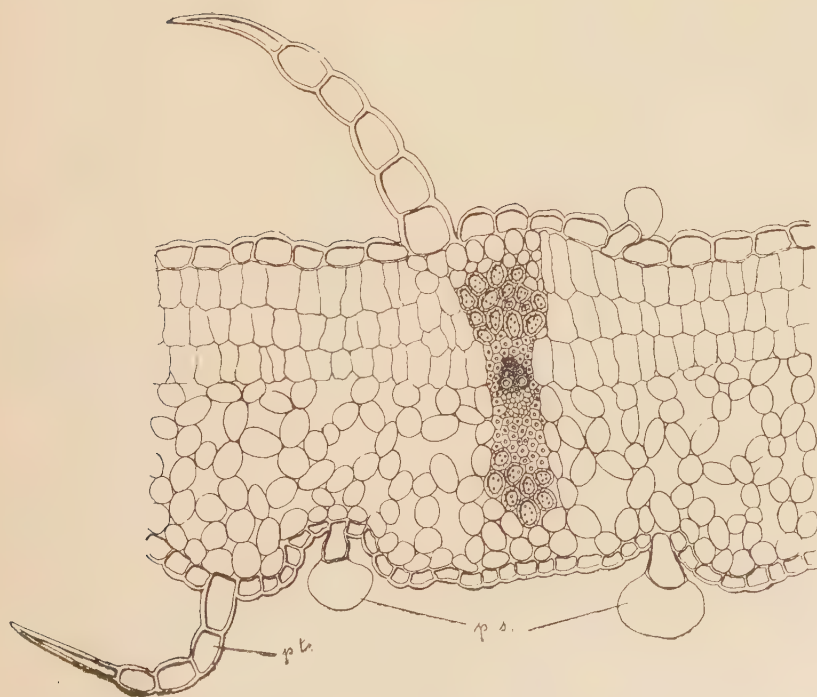


FIG. V. — Coupe transversale du limbe.
(Gross. : 170 d)

pt. : poil tecteur ; ps. : poils sécréteurs.

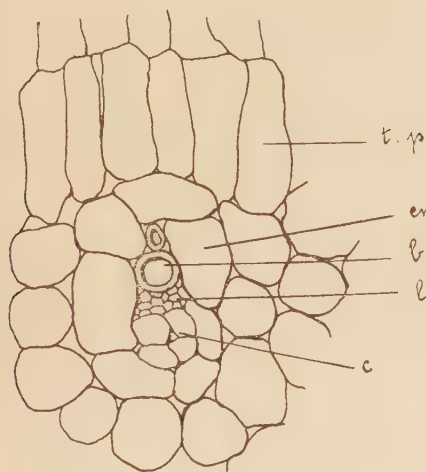


FIG. VI.

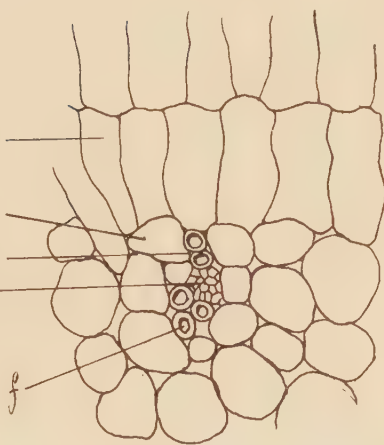


FIG. VII

(Gross. : 340 d).

tp. : tissu pallissadique ; *end.* : endoderme ; *l.* : liber ;
b. : bois ; *c.* : canal sécréteur ; *f.* : fibres.

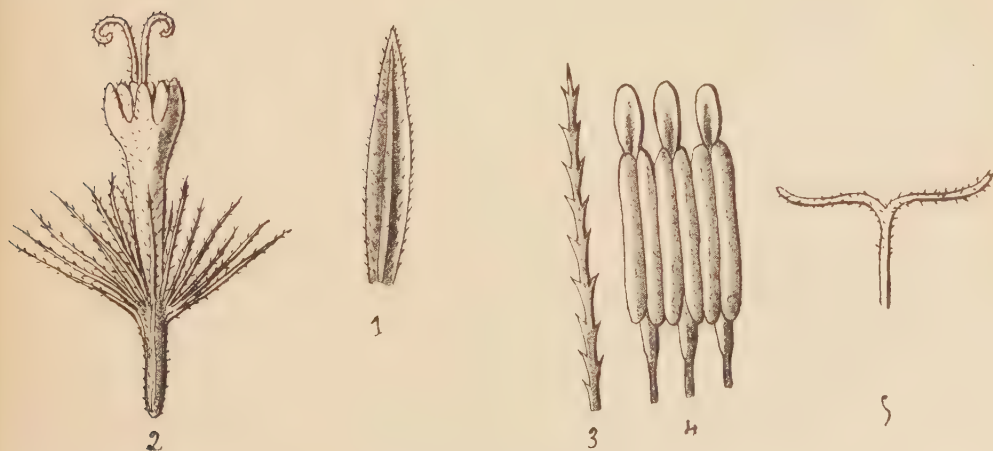


FIG. VIII. (d'après HEMSLEY).

1 : bractée de l'involucre ; 2 fleur ; 3 : paillette du pappus ;
 4 : anthères ; 5 : style.

ment striée. Poils sécréteurs ovoïdes, assez abondants, à fine cuticule.

La coupe transversale du limbe (fig. V) débute par un épiderme festonné, couvert d'une cuticule cellulosique peu épaissie. Il porte les poils tecteurs dressés étudiés plus haut et de rares poils sécréteurs à pédicelle unicellulaire, dont la partie capitée, irrégulière, est également unicellulaire. Au-dessous on trouve le tissu palissadique à trois rangées de cellules assez larges, puis le mésophylle, fortement lacuneux et composé de cellules ovales.

L'épiderme inférieur formé de petites cellules rectangulaires recouvertes d'une cuticule assez fine, porte des poils tecteurs analogues à ceux de la face supérieure, mais ils sont contournés et deviennent parallèles à la surface de la feuille.

Dans chaque crypte, peu profonde, formée par l'invagination de l'épiderme, on trouve un poil sécréteur. Celui-ci est à pied unicellulaire court, portant une tête subovoïde, à parois fines.

Le limbe est coupé régulièrement de piliers formés par le système libéro-ligneux. A ces endroits, chaque faisceau est protégé sur ses deux faces par une zone de fibres à lumen punctiforme se continuant jusqu'aux épidermes par des cellules scléreuses arrondies, à parois ponctuées.

Pas d'oxalate de calcium.

APPAREIL SÉCRÉTEUR. — Dans la feuille, les canaux sécréteurs très petits, apparaissent très vite ; ils sont alors situés, non pas dans l'endoderme, mais le plus souvent dans la région sous-jacente (fig. VI). Leur lumen est triangulaire et ils sont entourés de quatre cellules à peine différenciées. Très vite également, à une époque où le bois n'est, le plus souvent, repré-

senté encore que par un ou deux vaisseaux, le péri-cycle se différencie : des fibres apparaissent et, prenant naissance de l'intérieur à l'extérieur, donnent une zone de sclérenchyme qui se différencie rapidement et écrase le petit canal sécréteur. Celui-ci disparaît donc pour ainsi dire à peine formé (fig. VII). Il est en effet très difficile d'observer des coupes où l'on puisse bien distinguer cet organe. C'est pour cette raison que les feuilles adultes paraissent dépourvues d'éléments de sécrétion.

En résumé, les caractères de la plante sont ceux du groupe des Eupatoriées ; il est bien difficile de rapprocher cette espèce sans avoir fait l'étude de tout le groupe. On peut dire toutefois qu'elle se rapproche de l'*Eupatorium cannabinum* dont elle diffère par son liber entouré de sclérenchyme, alors que, dans cette espèce type, le liber est écrasé par une demi-lune de sclérenchyme.

Ce qui semble caractériser le *Stevia Rebaudiana*, c'est la présence de poils tecteurs d'aspect « boudiné » et de poils sécréteurs logés dans les cryptes inférieures de la feuille.

DEUXIÈME PARTIE.

Etude Chimique du principe sucré du Kaá hê-é [9].

CHAPITRE I.

Travaux antérieurs.

Le premier travail sur le principe sucré du *Stevia Rebaudiana* BERTONI est dû à O. REBAUDI [23]. Il date de 1900. Le D^r BERTONI en a donné la traduction française en 1905 [5].

O. REBAUDI n'a pas réussi à extraire le principe sucré à l'état cristallisé, mais il a trouvé que ses caractères correspondent à la glycyrrhizine, glucoside sucré de la réglisse. Le principe sucré du Kaá hê-é serait combiné dans la plante avec la soude, alors que dans la réglisse, il serait à l'état de sel ammoniacal. REBAUDI a encore retiré une résine aromatique contenant un principe amer particulier.

En 1908, P. RASENACK [22] après divers essais de préparation qui lui ont montré la différence existant entre le principe sucré du Kaá hê-é et celui de la réglisse, a donné les deux préparations suivantes :

1° Les feuilles, grossièrement pulvérisées, sont épuisées par 4 à 5 parties d'alcool absolu, soit 4 à 5 heures à température modérée, soit à froid, par macération de 4 jours ou par percolation. L'épuisement à froid est préférable.

La solution alcoolique est précipitée par 5 fois son poids d'éther. Le précipité, séparé du liquide, est lavé par un mélange de 9 parties d'éther et une partie d'alcool absolu, puis séché. Il obtient ainsi « le principe sucré brut » sous forme d'une poudre presque blanche, presque dépourvue de cendres. Pour le purifier, ce principe est dissous à chaud dans une à deux parties d'alcool méthylique : la solution se prend, par refroidissement, en une masse de cristaux qu'il recueille. Ces cristaux sont purifiés de nouveau dans l'alcool méthylique, 50 à 60 parties, une première fois, puis, 100 à 120 parties une seconde fois. Le rendement en produit purifié est de 2,5 à 3 p. 100.

La purification peut se faire aussi dans l'alcool méthylique dilué.

2° La solution alcoolique, provenant de l'épuisement des feuilles est traitée par l'acétate de plomb en solution alcoolique afin d'éliminer les tanins. Après séparation du précipité, le liquide débarrassé du plomb par l'hydrogène sulfuré est additionné d'éther, qui précipite le « principe sucré brut ». Celui-ci est alors purifié comme précédemment.

RASENACK recommande de ne pas concentrer la solution alcoolique débarrassée du plomb, avant de la

précipiter à l'éther, car, au cours de la concentration, il y a hydrolyse du principe sucré par l'acide acétique.

Le principe sucré pur se présente en aiguilles blanches, facilement solubles dans l'eau, l'alcool, l'alcool amylique, difficilement solubles dans l'alcool méthylique et l'acétone.

Au tube capillaire, il se contracte à $+ 180^{\circ}$ et fond en se décomposant à $+ 200^{\circ}$ - 210° , jamais au-dessus.

Il n'est pas azoté. « En solution aqueuse, à l'ébullition, il est nettement hydrolysé ».

L'acide sulfurique « très dilué » le dédouble à 100° : il se forme un produit lourd, cristallisé. RASENACK effectue l'hydrolyse en milieu alcoolique afin d'éviter la formation des cristaux. Une fois l'opération terminée, par évaporation de l'alcool il obtient le produit cristallisé.

Le sucre d'hydrolyse a été obtenu à l'état amorphe. Il donne la réaction de la glucosazone. RASENACK ne l'a pas caractérisé de façon plus précise.

Le produit cristallisé paraît avoir à peine besoin d'une autre purification. Toutefois, RASENACK l'a fait recristalliser dans l'alcool méthylique hydraté et dans l'acide acétique dilué. Il l'a obtenu en aiguilles dans le premier dissolvant, en feuilles et en colonnettes assez grosses dans le second.

Ce principe ne possède aucune saveur sucrée. Il fond à $+ 226^{\circ}$ - 227° . Il est soluble dans la lessive de soude diluée et dans l'ammoniaque : RASENACK en conclut qu'il paraît posséder un caractère acide.

RASENACK ne donne aucun rendement ni en principe cristallisé, ni en sucre.

Il a fait un certain nombre de combustions du principe sucré, cristallisé dans l'alcool méthylique pur

et dilué et une seule combustion du produit d'hydrolyse.

La moyenne des chiffres de 5 combustions est :

$$\begin{array}{l} \text{C} = 55,23 \text{ p. } 100 \\ \text{H} = 7,70 \text{ p. } 100 \end{array}$$

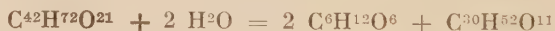
RASENACK propose d'accepter provisoirement la formule $\text{C}^{42}\text{H}^{72}\text{O}^{21}$ pour laquelle $\text{C} = 55,23 \text{ p. } 100$; $\text{H} = 7,95 \text{ p. } 100$. La combustion du produit d'hydrolyse a donné $\text{C} = 74,70$; $\text{H} = 8,50 \text{ p. } 100$. La formule proposée, $\text{C}^{30}\text{H}^{40}\text{O}^5$, exige $\text{C} = 74,95$; $\text{H} = 8,39 \text{ p. } 100$.

Mais, pour arriver à expliquer la formation d'un produit répondant à cette formule par hydrolyse du principe sucré, RASENACK donne l'équation suivante :



Il y aurait donc, d'après cette équation, formation de 4 H^2O , au cours de l'hydrolyse, alors que, dans toutes les hydrolyses de glucosides, à la formation de chaque molécule de sucre correspond l'absorption d'une molécule d'eau.

Il aurait donc fallu écrire :



Mais la composition du principe $\text{C}^{30}\text{H}^{52}\text{O}^{11}$ ne correspond pas du tout à celle donnée par l'analyse.

Trouvé	Théorie
C = 74,70	61,22
H = 8,50	8,84

Il est donc impossible d'admettre les résultats analytiques de RASENACK.

K. DIETERICH [14], en 1909, a donné un travail sur le même sujet. Comme RASENACK, il a remarqué que les feuilles ayant conservé leur teinte verte avaient

une saveur sucrée très intense. Les tiges âgées par contre n'étaient que peu sucrées et les jeunes tiges avaient une saveur sucrée plus forte, mais nettement inférieure à celle des feuilles.

Partant de 9 kg. d'un mélange de tiges et de feuilles, il a préparé, par décoction, un extrait aqueux qu'il a repris par l'alcool méthylique. Il a obtenu ainsi un produit brun noir, à saveur d'abord sucrée puis fortement amère, représentant 7 p. 100 du poids de plante. Ce produit a été dissous dans l'alcool méthylique et la solution additionnée d'alcool absolu ; il a séparé ainsi du premier produit deux principes à saveur sucrée, dont l'un est soluble dans l'alcool absolu et cristallisable, c'est l'*eupatorine* et l'autre insoluble dans l'alcool absolu et incristallisable, c'est la *rebaudine*.

Eupatorine. — La solution dans le mélange d'alcool méthylique et d'alcool absolu est précipitée par l'éther. Le précipité redissous dans l'alcool méthylique est additionné de nouveau d'éther. L'auteur répète ces opérations de dissolution et de précipitation jusqu'à ce que le précipité se prenne en une masse de cristaux.

Le produit est alors purifié par cristallisation dans l'alcool absolu et on obtient finalement l'eupatorine pure.

DIETERICH n'indique pas le rendement.

L'eupatorine possède une saveur très sucrée que l'auteur estime être 150 fois supérieure à celle du saccharose.

Elle est très soluble dans l'eau, mais la solution aqueuse laisse déposer un produit cristallisé en aiguilles feutrées comme la caféine, dont la saveur su-

crée est moins prononcée que celle de l'eupatorine et que l'auteur regarde comme « représentant un produit de dédoublement ».

L'eupatorine est lévogyre, mais le pouvoir rotatoire n'est pas indiqué. Elle n'a pas de point de fusion net : elle fond en s'altérant vers $+ 214^{\circ}$ - 215° . Elle n'est pas azotée.

Si l'on ajoute à une solution d'eupatorine dans l'alcool méthylique de la lessive de soude, il se forme un précipité « jaune » que DIETERICH considère comme le sel de sodium de l'eupatorine.

Incomplètement purifiée, elle donne une coloration verte par le perchlorure de fer, mais l'intensité de cette coloration diminue au fur et à mesure des purifications : la coloration serait donc due à une impureté.

L'eupatorine ne réduit pas la liqueur cupro-alcaline.

Par ébullition dans l'acide sulfurique dilué ou « dans l'acide acétique », il se forme un précipité incolore, cristallisé, et la liqueur devient réductrice. On ne trouve, dans le Mémoire, aucun renseignement sur le sucre réducteur formé au cours de cette hydrolyse ni sur le produit non glucidique, cristallisé.

DIETERICH ne propose aucune formule pour l'eupatorine.

Rebaudine. - - Le précipité formé par addition d'alcool absolu dans la solution méthylique du produit sucré brut renferme la rebaudine, insoluble dans l'alcool absolu. Il est à remarquer que RASENACK ne signale pas cette substance.

En dépit de 20 précipitations successives de la solution méthylique par l'éther, DIETERICH n'a pas pu l'obtenir à l'état cristallisé.

La rebaudine se présente comme une masse amorphe, brune, devenant brun clair par pulvérisation. Elle renferme 10 à 11 p. 100 de cendre et DIETERICH la considère comme un mélange des sels de potassium et de sodium de l'eupatorine. Cette assertion d'ailleurs n'est nullement vérifiée puisqu'il n'a pu extraire d'eupatorine après addition d'un acide minéral.

Par hydrolyse acide, la rebaudine donne un produit blanc, insoluble. Comme l'eupatorine, la rebaudine est lévogyre, mais aucune valeur n'est indiquée.

La rebaudine serait un peu plus sucrée que l'eupatorine, 180 fois plus que le saccharose.

La solution aqueuse mousse fortement par agitation.

DIETERICH a encore extrait un certain nombre de principes mal déterminés que nous ne ferons que citer : une huile grasse, une résine, une substance amère et une cire.

Il termine son travail par quelques considérations sur l'emploi possible des feuilles en pharmacie, en utilisant leur pouvoir sucrant considérable, mais cet emploi devrait être précédé d'une étude physiologique.

En 1915, R. KOBERT [19], en se basant sur des considérations théoriques a conclu que l'eupatorine est une saponine. Son raisonnement est le suivant :

RASENACK attribue à l'eupatorine la formule $C^{42}H^{70}O^{21}$. KOBERT écrit cette formule $C^{42}H^{68}O^{20}$, H^2O . Il la divise par deux, trouve donc $C^{21}H^{34}O^{10}$ et la fait entrer de cette façon dans la catégorie des produits à formule générale $C_nH^{2n-8}O^{10}$ qui serait, d'après lui, celle de beaucoup de saponines.

Il a voulu vérifier cette hypothèse et il a trouvé dans les tiges et les feuilles du *Stevia Rebaudiana*

Bertoni deux saponines, l'une neutre et l'autre acide.

La saponine acide n'est pas sucrée, mais elle possède des propriétés hémolytiques : à la dose de 1 p. 500, elle hémolyse complètement les globules sanguins.

La saponine neutre est l'eupatorine de DIETERICH et possède la saveur sucrée caractéristique de ce principe. Ses propriétés hémolytiques sont très nettes également, ainsi que celles de son produit non glucidique d'hydrolyse que l'auteur appelle une sapogénine.

Dans un travail antérieur, datant de 1912 [18], le même auteur aurait indiqué les propriétés qui, d'après lui, caractérisent chimiquement et physiologiquement une saponine : les saponines constituent un groupe de glucosides non azotés, la plupart de nature colloïdale, dont la solution aqueuse mousse par agitation et qui provoquent l'hémolyse des globules sanguins.

Les deux produits qu'il a extraits du *Stevia Rebaudiana* possédant ces propriétés, ses vues théoriques, basées sur une formule erronée, comme nous l'avons établi, se trouvent donc vérifiées. On devrait ainsi considérer l'eupatorine de DIETERICH comme entrant dans la classe des saponines.

En 1918, BERTONI [6], dans un article de revue sur le *Stevia Rebaudiana*, a demandé que soit corrigée une erreur de dénomination commise par DIETERICH.

DIETERICH, qui n'avait pas eu connaissance, en 1909, du travail botanique de BERTONI, datant de 1905 [5], a nommé le Kaá hê-cé *Eupatorium Rebaudianum*, du premier nom donné par BERTONI [4], en 1899. Il s'ensuit qu'il a appelé le principe sucré qu'il en a extrait eupatorine.

BERTONI s'élève contre ce nom d'eupatorine qui désigne un principe immédiat retiré d'une plante n'appartenant pas au genre *Eupatorium* et demande que ce nom soit remplacé par un autre rappelant le genre dans lequel il range maintenant le Kaá hê-é, le genre *Stevia*. Il propose le nom de *Estevina* = *Stévine*.

A notre avis, cette réclamation de BERTONI est fondée et l'on doit supprimer un nom prêtant à confusion. Pour nous conformer, d'une part, à la demande de BERTONI, et, d'autre part, aux décisions de l'Union Internationale de la Chimie (Copenhague, 1924), nous adopterons pour désigner le principe sucré retiré du *Stevia Rebaudiana* Bertoni, le nom de *Stévioside*.

CHAPITRE II.

Essais de caractérisation d'un glucoside.

Le Kaá hê-é que nous avons reçu du Paraguay consistait en un mélange de tiges et de feuilles, les feuilles s'étant en partie détachées des tiges. Nous avons fini de les séparer de façon à pouvoir faire une étude distincte des deux organes.

Nous donnerons d'abord les essais biochimiques effectués sur les feuilles et sur les tiges. Nous caractériserons ensuite un glucoside par hydrolyse acide d'un liquide aqueux déféqué.

A. FEUILLES.

1° **Essai biochimique.** — Les feuilles soigneusement triées (100 g.) ont été jetées dans un litre d'alcool à 70° bouillant. Après 20 minutes d'ébullition, le liquide a été décanté et, les feuilles hachées finement ont été traitées de la même façon par une nouvelle quantité d'alcool. Les liquides alcooliques réunis et distillés à sec, sous pression réduite, ont fourni un résidu que nous avons dissous dans l'eau à chaud. La solution filtrée, a été complétée à 400 cm³ avec les eaux de lavage du précipité insoluble et du filtre.

On a fait agir l'invertine sur ce liquide. Les résultats ci-dessous furent obtenus après défécation totale

par l'extract de Saturne et ramenés à un liquide dont 100 cm³ correspondent à 100 g. de feuilles sèches.

	Rotation ($l = 2$)	Sucre réducteur (pour 100 cm ³)
	—	—
Avant l'essai.....	— 10°55'	0 g.,864
Après l'essai.....	— 11°45'	1 g.,125

Il faut d'abord remarquer la très forte rotation gauche initiale qui indique la présence, en quantité importante, d'un principe lévogyre, non précipitable par l'extract de Saturne.

L'action de l'invertine est faible : pour un changement de rotation vers la gauche de 50', il s'est fait 0 g.,261 de sucre réducteur exprimé en glucose. L'indice de réduction enzymolytique, 313, est notablement inférieur à celui du saccharose et des autres sucres connus.

L'action de l'invertine étant terminée, le liquide est divisé en deux parties. On ajoute de l'émulsine dans la première et de la rhamnodiastase dans la seconde. L'action de la rhamnodiastase est à peu près nulle.

L'action de l'émulsine est plus nette.

	Rotation ($l = 2$)	Sucre réducteur (pour 100 cm ³)
	—	—
Avant l'action de l'émulsine	— 11°45'	1 g.,125
Après l'action de l'émulsine	— 10°49'	1 g.,347

Pour un retour de la déviation vers la droite de 56' il s'est fait 0 g.,222 de sucre réducteur, soit un indice de 238.

On doit conclure que les feuilles de *Stevia Rebaudiana* Bertoni contiennent, en petite quantité, un glucoside hydrolysable par l'émulsine.

Mais ce n'est pas à la présence de ce glucoside

qu'est due la forte rotation gauche des liquides, puisque cette rotation reste encore très fortement gauche après l'action de l'émulsine.

D'autre part, la saveur très sucrée du liquide n'avait pas changée après hydrolyse par l'émulsine ; le principe sucré ne semble donc pas être hydrolysable par ce produit fermentaire, tout au moins dans ces conditions.

Pour avoir une indication plus précise sur la nature de ce principe lévogyre, nous avons fait une hydrolyse acide.

2° Hydrolyse acide. — Comme pour l'essai biochimique, nous avons préparé une solution aqueuse de l'extrait alcoolique, qui est défécquée complètement par l'extrait de Saturne, filtrée, débarrassée de l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré, filtrée de nouveau et concentrée, sous pression réduite, à $+ 50^{\circ}$. Le liquide est alors amené à un volume tel que 100 cm^3 correspondent à 20 g. de feuilles. Après dosage du sucre réducteur et détermination de la rotation, on ajoute un volume égal d'acide sulfurique à 6 p. 100 et on répartit le mélange en tubes scellés. Ces tubes sont chauffés à l'autoclave à $+ 105^{\circ}$. Il se forme un abondant précipité brun qu'on sépare par filtration.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus (100 $\text{cm}^3 = 20$ g. de feuilles) :

	Rotation ($t = 2$)	Sucre réducteur p. 100 cm^3	Indice de réduction
avant l'hydrolyse.....	— $2^{\circ}20'$	0 g.,227	—
après 1 heure.....	+ $1^{\circ}32'$	2 g.,162	500
— 2 —	+ $1^{\circ}36'$	2 g.,178	495
— 3 —	+ $1^{\circ}36'$	2 g.,171	494

L'hydrolyse est terminée en 2 heures. Pour un changement de rotation vers la droite de $3^{\circ}56'$, il s'est formé 1 g.,951 de sucre réducteur, soit un indice de 495.

Le liquide a perdu sa saveur sucrée : le principe sucré a donc été hydrolysé. Cet essai montre que ce principe existe en très grande quantité dans les feuilles, puisque, pour 100 g. de ces organes, il s'est formé 9 g.,755 de sucre réducteur qui ne représente qu'une partie du glucoside, le produit non glucidique étant vraisemblablement formé par le précipité qui a pris naissance au cours de l'hydrolyse.

B. TIGES.

1° Essai biochimique. — 100 g. de tiges, réduites au hachoir en menus morceaux sont traitées à l'ébullition à reflux pendant 20 minutes par dix fois leur poids d'alcool à 70°. Après décantation, on effectue un deuxième épuisement identique, puis, les liquides alcooliques sont distillés à sec. Le résidu repris par l'eau tiède, filtré, est dilué à 400 cm³. Il est à remarquer que ce liquide a une saveur nettement sucrée, mais infiniment moins cependant que la liqueur extractive des feuilles. Sur une partie de la liqueur préalablement défécquée, on prend la déviation et on dose les sucres tandis que le reste du liquide extractif, additionné de toluène, est soumis à l'étuve à 30° à l'action de l'invertine. Les résultats ci-après sont exprimés pour un liquide dont 100 cm³ = 100 g. de tiges.

	Rotation du liquide ($l = 2$)	Sucre réducteur (exprimé en glucose)
à l'origine.....	— 3°40	1 g.,136
Après action de l'invertine)	après 7 jours — 4°4'	1 g.,381
	après 3 mois. — 4°19'	1 g.,548
	après 10 mois — 4°36'	1 g.,686

Par l'invertine :	Après 7 jours	Après 3 mois	Après 10 mois
Changement de déviation	24'	39'	56'
Sucre réducteur formé...	0,245	0,412	0,550
Indice enzymolitique.....	612	633	591

Les indices obtenus sont assez voisins de celui du saccharose (604) et permettent de conclure à l'existence de ce sucre dans les tiges ; cependant, d'après l'action relativement faible de l'invertine même après plusieurs mois, il est à croire qu'il ne s'y trouverait qu'en assez petite quantité.

Après destruction de l'invertine, on fait agir sur le liquide l'émulsine et la ramnodiaxase ; celles-ci, après un mois, n'ont provoqué que de minimes variations du sucre réducteur : la déviation est aussi sensiblement la même. Leur action peut donc être considérée comme nulle.

Ainsi, dans les tiges, l'invertine indique la présence d'une petite quantité de saccharose ; par contre, comme dans les feuilles, l'émulsine et la rhamnodiaxase restent sans action.

2° Hydrolyse par les acides. — Nous avons prélevé 200 cm³ du liquide extractif précédent correspondant à 50 g. de tiges. Après défécation complète par le sous-acétate de plomb, élimination du plomb en excès par H²S et lavage des précipités, la liqueur est ramenée par concentration dans le vide, à basse température,

à son volume initial. Après dosage du sucre réducteur et détermination de la rotation, on ajoute un volume égal d'acide sulfurique à 8 % et on répartit en tubes scellés dont les uns sont chauffés au B.-M. bouillant et les autres à l'autoclave à + 110°-115°. Le liquide brunit légèrement et donne naissance à quelques rares cristaux, mais point à un abondant précipité lenticulaire comme pour les feuilles.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus (100 cm³ = 25 g. de tiges).

Tubes chauffés au B. M.			
	Déviatiôn (<i>l</i> = 2)	S. R. (p. 100 cm ³)	Indice
au départ.....	$\alpha = - 1^{\circ}$	0,366	
après 3 heures....	$\alpha = - 28'$	0,6616	557
après 4 heures....	$\alpha = - 28'$	0,6562	547

Tubes chauffés à + 110-115°.			
	Déviatiôn	S. R. (p. 1.000 cm ³)	Indice
au départ.....	$\alpha = 1^{\circ} 2'$	0,3905	
après 3 heures....	$\alpha = - 3'$	0,5062	102
après 4 heures....	$\alpha = - 4'$	0,4554	60
après 5 heures....	$\alpha = - 2'$	0,4352	40

L'indice de 557 que l'on obtient après 3 heures de chauffe au B.-M. bouillant est un peu plus élevé que celui que nous avons obtenu dans l'essai d'hydrolyse acide de l'extractum de feuilles (495).

S'il existe encore un peu de saccharose dans la liqueur soumise à l'action de l'acide sulfurique, celui-ci est dédoublé en même temps que le stévioside. Comme les indices d'hydrolyse de ces deux corps sont de sens contraire, on obtient finalement un indice un peu supérieur à celui du stévioside. Quant à la déviation fortement gauche après hydrolyse de 3 heu-

res, elle peut être due au lévulose. D'ailleurs l'action prolongée de l'acide, en particulier à $+ 110^{\circ}$ - 115° diminue cette rotation et, en même temps, diminue le sucre réducteur. On sait que le lévulose est un sucre très sensible à l'action des acides.

D'après ces expériences on voit, qu'à côté d'une petite quantité de stévioside, les tiges semblent renfermer un peu de saccharose.

CHAPITRE III.

Préparation du stévioside.

Nous avons suivi deux procédés d'extraction. Nous avons d'abord opéré sur des liquides non déféqués obtenus sans faire intervenir l'action de la chaleur afin d'éviter toute altération possible du stévioside.

Mais le procédé étant onéreux, nous avons cherché à en trouver un autre dans lequel la séparation des impuretés non dissoutes dans le premier procédé, a été effectuée par la défécation à l'extrait de Saturne qui, dans certaines conditions, ne précipite le principe sucré qu'en minime quantité. Nous avons réussi à obtenir ainsi de bons rendements en produit cristallisé et nous avons reconnu que ses propriétés ne sont pas changées par la défécation.

1^o Procédé sans défécation. — Les feuilles, réduites en poudre demi-fine, sont épuisées par percolation rapide, par 10 fois leur poids d'alcool absolu. La colature est d'une belle teinte verte et possède une saveur sucrée très prononcée. Par addition de 5 volumes d'éther anhydre, il se fait un abondant précipité blanc grisâtre qu'on laisse déposer. Le liquide est séparé par décantation et le précipité est lavé plusieurs fois à l'éther, puis desséché dans le vide, à $+ 35^{\circ}$. Il est repris, à cette température, par une faible quantité d'alcool méthylique anhydre qui le dis-

sout : la solution se prend très rapidement en une masse de cristaux que l'on recueille et qu'on sèche dans le vide. Ces cristaux constituent le stévioside. Pour 1 kg. de feuilles, on en a obtenu 45 g.

Ce traitement à l'avantage de ne pas faire intervenir l'action de la chaleur et il est permis de penser qu'on doit obtenir ainsi le principe sucré tel qu'il existe dans les feuilles. Mais il exige l'emploi de fortes quantités d'alcool absolu, et surtout d'éther anhydre. Pour un kg. de feuilles, il faut en effet 10 kg. d'alcool absolu, 50 litres d'éther pour faire la précipitation et 10 litres d'éther pour les lavages, soit, en tout, 60 litres. Aussi, il ne pouvait pas être question de l'utiliser pour obtenir des quantités suffisantes de stévioside permettant d'en aborder l'étude.

C'est pourquoi nous avons cherché un autre procédé moins onéreux.

2° Procédé par défécation. — Dans ce procédé, l'épuisement des feuilles peut se faire par percolation ou par traitement à l'ébullition.

a) *Par l'alcool bouillant.* — Les feuilles (1 kg.), plus ou moins brisées, sont jetées dans 8 fois leur poids d'alcool à 70° bouillant. On maintient à l'ébullition 20 minutes. Après refroidissement, on exprime les feuilles, on les hache finement et on les épuise par 5 fois leur poids de nouvel alcool à 70° bouillant. La poudre est ensuite fortement exprimée et les solutions alcooliques réunies et filtrées. Elles sont ensuite distillées à l'alambic pour récupérer l'alcool. Le résidu aqueux qui occupe un volume de 3 litres environ, est filtré et distillé à sec, sous pression réduite. La distillation est pénible car il se fait dans le ballon une mousse persistante difficile à faire tomber. Les 400 g. de résidu

obtenus en fin d'opération sont alors dissous dans l'eau de façon à obtenir 4 litres de solution qu'on filtre et qu'on défèque complètement par l'extrait de Saturne. Il faut en employer 700 cm³. Le précipité plombique, très abondant, est essoré, lavé et mis de côté. Le liquide est débarrassé du plomb en excès par l'hydrogène sulfuré et le précipité de sulfure de plomb est essoré, lavé et également mis de côté.

Le liquide est distillé à sec, sous pression réduite, sans dépasser + 50°, afin d'éviter une hydrolyse possible par l'acide acétique amené par les 700 cm³ d'extrait de Saturne (70 g. environ). La défécation n'a pas éliminé le principe qui fait mousser fortement le liquide et la distillation est longue. Il reste finalement 188 g. d'un extrait jaune brun qu'on traite par le procédé de précipitation de DIETERICH.

Dissous à chaud dans 400 cm³ d'alcool méthylique, on ajoute à cette solution 4 litres d'alcool absolu, ce qui amène la formation d'un volumineux précipité grisâtre qu'on laisse déposer. On obtient ainsi un liquide qui doit contenir, suivant DIETERICH, le principe sucré cristallisable (eupatorine : stévioside) et un précipité qui doit contenir le principe sucré incristallisable (rebaudine). Le liquide est séparé par décantation et le précipité est mis de côté en vue d'une recherche sur la rebaudine.

Le liquide alcoolique, limpide, est distillé à sec, sous pression réduite. Le résidu est repris à chaud par 200 cm³ d'alcool méthylique et la solution est précipitée par l'éther. Après décantation du liquide limpide, le précipité est desséché dans le vide, au bain-marie bouillant. On peut faire cristalliser directement le stévioside en partant de cet extrait ; mais le produit obtenu est impur et a besoin de nombreuses purifications.

Pour avoir d'emblée un produit cristallisé déjà très pur, il est nécessaire de faire subir à cet extrait deux autres purifications semblables par dissolution dans l'alcool méthylique et précipitation par l'éther.

Finalement, l'extrait, bien desséché, doit être blanc crème et non jaune. Il est alors dissous à l'ébullition, dans 210 cm³ d'alcool méthylique et, par refroidissement, la cristallisation commence très rapidement.

Les cristaux recueillis le lendemain, lavés à l'alcool méthylique, sont séchés dans le vide sulfurique. Le stévioside ainsi obtenu, est déjà très pur, incolore, à saveur très fortement sucrée et absolument identique à celui qu'on prépare par le premier procédé.

Le rendement est meilleur : de 38 à 45 g. par kg. de feuilles, suivant les opérations.

D'autre part, il est possible de récupérer une quantité importante du stévioside, entraîné par adsorption d'une part, sur le précipité plombique et, d'autre part, sur le sulfure de plomb.

On peut diminuer la quantité de stévioside adsorbé en effectuant la défécation dans un liquide plus dilué, mais la distillation étant pénible à cause de la mousse persistante, il vaut mieux opérer dans un liquide plus concentré, comme nous l'avons fait, et récupérer ensuite le stévioside adsorbé.

Le précipité plombique, desséché et pulvérisé (580 g.), est épuisé à deux reprises, à l'ébullition par un litre d'alcool méthylique. Les liquides sont réunis, décolorés au noir, filtrés et distillés à sec. Le résidu est dissous à l'ébullition, dans 70 à 80 cm³ d'alcool méthylique. La solution cristallise et on obtient ainsi 20 g. de stévioside, moins pur toutefois que le précédent.

Par ce procédé, on obtient donc finalement 60 à 65 g. de stévioside par kilogramme de feuilles,

b) *Par percolation.* — Les feuilles, en poudre demi-fine, sont épuisées, par percolation rapide, par 10 fois leur poids d'alcool à 70°.

La colature est traitée exactement comme la solution alcoolique obtenue à chaud. Elle a l'avantage d'être chargée de moins d'impuretés puisque la défécation totale est obtenue avec 600 cm³ d'extrait de Saturne au lieu de 700 cm³. Il s'ensuit que l'adsorption du stévioside par le précipité plombique est moins forte et que l'on obtient d'emblée une quantité plus forte de stévioside pur : 52 g. au lieu de 38 à 42 g. Mais le traitement du précipité plombique et du sulfure de plomb fournit moins de stévioside et le rendement final est le même.

Dans les deux procédés de préparation, l'épuisement du précipité plombique peut se faire dans un appareil de Soxhlet, à condition que le précipité soit finement pulvérisé et pas trop tassé. Dans ces conditions, le rendement en produit récupéré est un peu augmenté.

Purification. — Pour avoir le stévioside absolument pur, il faut faire subir au produit précédent, déjà très pur, une cristallisation dans l'alcool méthylique, suivie d'une cristallisation dans l'alcool absolu.

Le stévioside, finement pulvérisé, est dissous, à l'ébullition, dans l'alcool méthylique, dans la proportion de 10 g. par litre. On décolore au noir et on filtre. Le liquide doit être absolument incolore. On recueille les cristaux le lendemain ; on les lave à l'alcool méthylique et on les sèche dans le vide sulfurique.

Une cristallisation dans l'alcool absolu où le stévioside est plus soluble que dans l'alcool méthylique donne un produit pur.

En partant de 100 g., on obtient, après ces deux cristallisations, 80 g. de stéviolide pur. Nous avons préparé, en tout, plus de 300 g. de produit pur.

Extraction du stéviolide des tiges.

Les tiges (1000 g.), mondées des herbes étrangères qu'elles contiennent, hachées, puis réduites au moulin en poudre grossière, sont épuisées par percolation rapide par 10 litres d'alcool à 70°. La colature brune ainsi obtenue a une saveur sucrée très nette, mais beaucoup moins intense cependant que celle des feuilles. Distillée à sec dans le vide, elle fournit 168 g. de résidu. Celui-ci repris par l'eau donne une solution qui, après défécation par l'extrait de Saturne et élimination du plomb en excès est évaporée à siccité sous pression réduite sans dépasser + 50°. Le résidu dissous à chaud dans l'alcool méthylique est additionné d'alcool absolu (2 litres) : il se forme un précipité blanchâtre ténu et abondant. Après dépôt, le liquide alcoolique surnageant, décanté, est évaporé à sec ; le résidu dissous à chaud dans très peu d'alcool méthylique donne lieu, après amorçage, à une cristallisation. Nous avons recueilli 2 g.,60 de glucoside brut. Ce produit purifié présentait les mêmes propriétés physiques et chimiques que le stéviolide extrait des feuilles. Nous n'avons pu extraire de glucoside du précipité plombique.

Un autre traitement des tiges par l'alcool bouillant ne nous a pas donné un rendement meilleur en glucoside.

CHAPITRE IV.

Existence d'un seul glucoside sucré dans le Kaá hê-é ; la rebaudine de Dieterich est du stévioside impur [9].

Nous avons indiqué, dans l'analyse des travaux antérieurs que DIETERICH avait retiré des feuilles du *Stevia Rebaudiana* BERTONI, deux principes sucrés : un principe cristallisable, l'eupatorine que nous appelons maintenant stévioside et un principe incristallisable, la rebaudine.

Dans le mode de préparation que nous avons donné, nous effectuons, en précipitant la solution méthyllique de l'extrait sucré par l'alcool absolu la séparation du stévioside qui reste en solution, de la rebaudine qui est précipitée.

Le précipité séparé du liquide possède effectivement, une saveur sucrée très prononcée.

DIETERICH suppose que la rebaudine incristallisable est un mélange des sels de potassium et de sodium du stévioside. Le stévioside n'étant pas un acide, cette hypothèse était peu vraisemblable. Toutefois, nous avons cherché à la vérifier. L'extrait contenant la rebaudine a été dissous dans l'alcool méthyllique. A cette solution, on a ajouté de l'acide sulfurique dilué jusqu'à virage au vert du violet de méthyle. De cette façon, si la solution contient le stévioside à

l'état de sel, celui-ci doit être mis en liberté et on doit pouvoir ensuite l'extraire à l'état cristallisé.

Il nous a été impossible d'extraire du stévioside du mélange acidifié.

Nous avons alors supposé, que le stévioside qui est plus soluble à l'état pur dans l'alcool absolu que dans l'alcool méthylique ne pouvait être précipité de sa solution méthylique par addition d'alcool absolu que parce que qu'il était adsorbé par les matières minérales et organiques précipitées par l'alcool absolu. Cette adsorption serait absolument comparable à celle qui a été signalée avec le précipité plombique et avec le sulfure de plomb.

Pour vérifier cette supposition, il fallait donc essayer de maintenir le stévioside en solution, tout en précipitant les impuretés insolubles dans l'alcool absolu. Nous avons opéré de la façon suivante :

Le précipité obtenu par addition d'alcool absolu à la solution méthylique a été desséché. Il se dissout très facilement dans 150 cm³ d'alcool absolu bouillant. Cette solution, versée dans 2500 cm³ d'alcool absolu, précipite abondamment. Le précipité jaune, très ténu, se dépose lentement ; on filtre et le filtrat alcoolique est distillé à sec. Le produit peu coloré ainsi obtenu, très sucré, est dissous dans la plus petite quantité possible d'alcool absolu. La solution est précipitée par l'éther. Le précipité desséché est dissous, à l'ébullition, dans 110 cm³ d'alcool méthylique. Le liquide brunâtre laisse déposer par refroidissement, des cristaux qui, recueillis et séchés dans le vide sulfurique, pèsent 6 g.,15. On les purifie par cristallisation dans l'alcool méthylique, puis dans l'alcool absolu. Le produit pur pèse 5 g.,20 et il est absolument identique au stévioside obtenu précédem-

ment. Il possède la même forme cristalline, le même point de fusion, $+ 238^{\circ}$ - 239° le même pouvoir rotatoire, les mêmes réactions de coloration.

Il ne peut donc y avoir aucun doute : la rebaudine de DIETERICH n'est pas un mélange des sels de potassium et de sodium du stéviolside. Ce n'est qu'un mélange de stéviolside et de matières minérales et organiques.

Le stéviolside se trouve dans le précipité formé par l'alcool absolu parce qu'il a été entraîné par adsorption.

La rebaudine, mélange des sels de potassium et de sodium du stéviolside, n'existe donc pas comme principe immédiat chimiquement défini et ce nom doit disparaître de la nomenclature chimique.

Le seul principe sucré du *Stevia Rebaudiana* BERTONI est le stéviolside.

CHAPITRE V.

Propriétés du Stévioside.

1° PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

Le stévioside pur, cristallisé dans l'alcool absolu ou dans l'alcool méthylique et séché dans le vide sulfurique, se présente sous la forme d'une poudre légère, incolore.

Il est constitué, au microscope, dans le premier cas, par des prismes allongés, incolores, plus ou moins volumineux et, dans le second, par de longues aiguilles soyeuses, réunies en houppes.

Il est inodore. Il possède une saveur extrêmement sucrée quand on en met une très petite quantité sur la langue. Cette saveur rappelle celle de la feuille elle-même et un peu celle de la glycyrrhizine. Pris en quantité relativement forte, la saveur sucrée, fait place rapidement à une saveur amère assez prononcée et persistante. Ce n'est donc qu'à un état de grande dilution que l'on peut évaluer le pouvoir sucrant considérable du stévioside. Pour avoir une solution de stévioside dont le pouvoir sucrant soit celui d'une solution de saccharose à 1 p. 100, il suffit de dissoudre, dans 10 cm³, 3 mg.,5 environ de stévioside. Le pouvoir sucrant du stévioside est donc *300 fois* celui du sucre de canne.

C'est à l'heure actuelle, le produit naturel le plus sucré.

Son point de fusion manque de netteté. Toutefois au bloc Maquenné, il fond instantanément à $+ 238^{\circ}$ - 239° . DIETERICH a indiqué $+ 214^{\circ}$ - 215° et RASENACK $+ 200^{\circ}$ - 210° ; leur produit n'était donc pas pur.

Stabilité à l'air. — Le stévioside paraît se conserver à l'air sans altération : il reste pulvérent et ne change nullement d'aspect. Mais il n'est pas stable, en ce sens qu'il augmente ou diminue de poids suivant l'état hygrométrique de l'air.

Maintenu dans le vide sulfurique, il perd du poids peu à peu. En deux mois, cette perte s'est élevée à 2,60 p. 100. Exposé à l'air, il absorbe alors de l'eau rapidement, mais en quantités variables suivant les échantillons. Cette eau est d'ailleurs difficile à éliminer complètement sans altération du stévioside.

A $+ 110^{\circ}$, le stévioside s'altère avant que sa dessiccation ne soit totale. Dans le vide, dans l'appareil de BOUILLLOT, on ne peut dépasser $+ 50^{\circ}$, car à une température plus élevée, on constate, à chaque pesée, une perte régulière de poids, sans altération apparente du stévioside. Nous avons supposé que cette perte régulière et continue était due à une légère volatilisation du stévioside.

A $+ 50^{\circ}$, il faut de 10 à 11 h., pour atteindre un poids constant. Les pertes de poids sont variables suivant les échantillons. Nous avons trouvé, par exemple, 5,85 ; 6,08 ; 7,50 ; 8,52 p. 100.

Le stévioside ainsi desséché à poids constant absorbe très rapidement de l'eau quand on l'expose de nouveau à l'air. La quantité d'eau absorbée est variable et n'est pas toujours la même que la quantité perdue par dessiccation.

Ainsi, l'échantillon ayant perdu 6,08 p. 100 a re-

pris, en 2 h., 1,72 p. 100 ; en 7 h., 3,35 p. 100 ; en 24 h., 5,54 p. 100, puis sa teneur en eau a pris en 8 jours les valeurs suivantes : 5,94 ; 6,01 et, finalement, 5,35 p. 100.

Toutefois, le stéviolide ainsi maintenu pendant 8 jours à l'air et enfermé ensuite dans un flacon sec et bien bouché ne subit plus que des variations insensibles.

Pour la détermination des constantes physiques et chimiques, nous avons utilisé, non pas le stéviolide anhydre, d'une manipulation impossible, à cause de l'absorption rapide d'eau, mais un produit séché à poids constant, dans le vide, à $+ 50^{\circ}$, auquel nous avons laissé reprendre à l'air, en 8 jours, une quantité d'eau connue et qui a été enfermé ensuite dans un flacon sec et bien bouché.

Le stéviolide est lévogyre, comme l'avait observé DIETERICH. La détermination du pouvoir rotatoire a été effectuée sur une solution dans l'alcool à 95° d'un stéviolide à 4,44 p. 100 d'eau.

$$\begin{aligned} \text{Pouvoir rotatoire : } [\alpha]_{\text{D}} &= -30^{\circ},41 \\ (p &= 0 \text{ g., } 2000 ; v = 10 ; l = 2 ; \alpha = 1^{\circ}13') \end{aligned}$$

ce qui donne, pour le stéviolide anhydre, $[\alpha]_{\text{D}} = -31^{\circ},81$.

Le stéviolide est soluble à froid dans l'alcool absolu et les alcools forts, dans l'alcool méthylique. Il est très peu soluble dans l'éther acétique hydraté, a peu près insoluble dans l'éther, le chloroforme et l'éther de pétrole.

Il est également soluble dans l'eau. La solution aqueuse mousse très fortement par agitation et la mousse formée est très persistante. C'est donc au stéviolide qu'est due la propriété des liquides de mousser au cours de la distillation.

Solubilités. — La solubilité du stéviolside dans les différents solvants a été déterminée à la température du laboratoire (+ 18° + 20°).

100 g. d'alcool à 95° dissolvent.....	2 g. 854 de stéviolside
d'alcool à 50° —	2 g.,688 —
d'alcool abs. du —	0 g.,8952 —
d'alcool méthylique à 98-99° . . .	0 g.,1626 —
d'acétone anhydre	0 g.,136 —
d'eau distillée	0 g.,124 —
d'éther acétique hydraté.....	0 g.,0118 —
d'éther acétique anhydre	0 g.,0094 —
d'éther.....	0 g.,0077 —

On peut exprimer ces résultats sous la forme suivante :

1 g. de stéviolside est soluble à + 18°-20° dans :

35 g. d'alcool à 95°
37 g.,2 d'alcool à 50°
111 g.,7 d'alcool absolu
615 g. d'alcool méthylique à 99°
735 g.,3 d'acétone anhydre
806 g.,4 d'eau
8,474 g. d'éther acétique hydraté
10,638 g. d'éther acétique anhydre.

Le stéviolside est excessivement peu soluble dans l'éther de pétrole et le chloroforme.

Sa solubilité dans l'eau est particulière et mérite une étude spéciale.

Action de l'eau. — DIETERICH a signalé qu'une solution aqueuse de stéviolside laisse déposer rapidement un corps cristallisé en longues aiguilles feutrées, moins sucré que le stéviolside et qu'il considère comme un produit d'hydrolyse.

Si l'on dissout à chaud 2 à 3 g. de stéviolside dans 100 cm³ d'eau, on obtient une solution limpide qui

se prend, par refroidissement, en une masse de cristaux incolores. Ces cristaux, recueillis et séchés sont effectivement moins sucrés que le stéviolide, comme l'avait déjà observé DIETERICH.

DIETERICH pensait que ces cristaux étaient formés par un produit d'hydrolyse du glucoside. Mais il n'en est rien comme le montre l'essai suivant, dans lequel on a obtenu la précipitation sans intervention de la chaleur :

Par agitation à froid, on obtient assez facilement la dissolution de 0 g.,50 de stéviolide dans 100 cm³ d'eau. Au bout de quelques heures, la solution devient opalescente, puis il se forme de longues aiguilles enchevêtrées qui envahissent tout le liquide. Ces cristaux représentent un hydrate moins soluble et c'est à cause de cette solubilité moindre qu'ils paraissent moins sucrés.

On dissout 1 g.,0283 de stéviolide, à 2,8 p. 100 d'eau dans l'eau vers + 40°. Après refroidissement on complète à 100 cm³. Il se fait, en 48 heures, une abondante cristallisation. Ces cristaux recueillis et séchés à l'air, à la température ordinaire jusqu'à poids constant pèsent 0 g.,994.

D'autre part, la solution filtrée n'est pas réductrice, ce qui exclut l'hypothèse d'une hydrolyse du stéviolide. Elle contient seulement 0 g.,114 de résidu sec pour 100 cm³. Le poids total du produit obtenu est donc de 1 g.,108, alors qu'on a dissous seulement 1 g.,0283, soit une augmentation de 0 g.,0797, représentant 7,75 p. 100.

La teneur en eau des cristaux, à + 50°, dans le vide a été déterminée. On trouve, en 10 heures, pour 0 g.,6903, une perte de 0 g.,0720. La teneur en eau est donc de 10,43 p. 100.

Le pouvoir rotatoire, déterminé sur une solution dans l'acool à 95° est de

$$[\alpha]_D = -28^{\circ},77$$

($p = 0$ g.,1969 ; $v = 10$; $l = 2$; $\alpha = -1^{\circ}8'$) soit $-32^{\circ},11$ pour le produit anhydre, c'est-à-dire, sensiblement identique à celui du stévioside anhydre ($-31^{\circ},81$).

Il n'y a donc pas eu au cours de cette réaction, hydrolyse du stévioside, mais seulement formation d'un hydrate moins soluble : l'augmentation de la teneur en eau, 2,8 à 10,43, soit 7,63 p. 100 correspond sensiblement à l'augmentation du poids du stévioside, 7,75 p. 100.

Action de l'eau à haute température. — Après deux heures de chauffe au B.-M. bouillant, en tube scellé, la solution à 1 % de glucoside, reste parfaitement limpide. Le même tube chauffé 2 h. de plus à l'autoclave à $+130^{\circ}$ est encore parfaitement limpide, la saveur du liquide est très sucrée et le dosage du sucre réducteur accuse 0,0312 pour 100 de liquide (nous verrons que 1 g. de stévioside réduisent comme 0,030 de glucose). Donc, même à température élevée l'eau n'hydrolyse pas le stévioside.

En ce qui concerne la solubilisation du glucoside dans l'alcool à 50°, il se produit à peu près le même phénomène que pour l'eau : lorsqu'on fait une solution avec cet alcool par simple agitation à la température ordinaire, on arrive à dissoudre d'assez fortes quantités de stévioside, mais, au bout de 5 à 6 heures, il se fait dans la masse un abondant précipité d'aiguilles feutrées, et, finalement il ne reste en dissolution dans la liqueur surnageante, que la quantité de produit indiquée plus haut dans le tableau des solubilités.

2° PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

Si on dissout quelques milligrammes de stévioside dans 2 cm³ d'acide sulfurique pur, il se développe lentement à froid, et très rapidement au bain-marie, une teinte jaune passant au rouge, puis au brun violacé et au violet.

Une solution de stévioside dans l'acide acétique, additionnée de quelques gouttes d'acide sulfurique, donne au bain-marie bouillant, une coloration jaune d'or.

L'eau de brome, la soude, l'ammoniaque, le perchlorure de fer ne donnent aucune coloration.

La solution aqueuse de stévioside n'est précipitée par aucun des métaux lourds : acétate neutre et basique de plomb, acétate de cuivre, d'alumine, eau de baryte, chlorure de baryum, chlorure de mercure etc...

Le stévioside est très légèrement réducteur vis-à-vis de la liqueur cupro-alkaline. Son pouvoir réducteur a été déterminé par la méthode de M. G. BERTRAND sur 0 g.,500. Un gramme de stévioside anhydre réduit comme 0 g.,030 de glucose.

Hydrolyse par les acides. — Les acides minéraux dilués, hydrolysent le glucoside à chaud. De nombreux essais effectués avec de l'acide sulfurique de concentration croissante, nous ont permis de constater que, si le dédoublement se fait rapidement au début, le terme de l'hydrolyse par contre est assez difficile à atteindre. ROCHLEDER, étudiant en 1867 une saponine, mentionnait déjà cette difficulté pour certains glucosides formés de plusieurs molécules de sucres.

Le titre de l'acide qui convient le mieux est celui de 5 % en acide sulfurique. L'hydrolyse avec cet

acide est totale au bout de 3 heures à la température de 100°. Le tableau que nous donnons de quelques essais effectués, donne une idée de la marche de l'hydrolyse en fonction de la concentration en SO^4H^2 .

Dans des tubes contenant 15 cm³ d'une solution de stéviocide à 1 % on ajoute partie égale de SO^4H^2 à 1,2, 4,8, 10 % et d'acide acétique pur ; les tubes scellés, ces différents mélanges ont été chauffés 3 heures au bain-marie bouillant ; puis on a pris la déviation, dosé les sucres réducteurs et pesé le produit non glucidique. Le tableau de la page 50 donne les résultats de ces différentes expériences.

On voit que l'acide acétique au demi provoque aussi un commencement d'hydrolyse ; mais, il ne se produit pas de précipité, le principe non glucidique restant dissous dans la liqueur. De plus, le changement de déviation de cette dernière vers la droite est notablement diminué par suite du pouvoir rotatoire lévogyre du produit non glucidique restant en solution. Le dosage des sucres réducteurs indique qu'au bout de 3 heures il y a seulement un tiers du glucoside dédoublé.

Nous étant assuré qu'à la température de 100° et en solution sulfurique à 5 %, le stéviocide est complètement hydrolysé après 3 heures, nous avons alors procédé au dosage du sucre et du produit non glucidique.

Hydrolyse sulfurique. — A une solution à 1 p. 100 de stéviocide à 5,11 p. 100 d'eau, on ajoute un volume égal d'acide sulfurique au dixième. La solution présente une rotation de — 24' et contient 0 g.,014 de sucre réducteur, exprimé en glucose.

On la chauffe, en tube scellé, 3 heures, au bain-

TABLEAU I. — Hydrolyse d'une solution de stéviolose par SO^4H^2 à différentes concentrations
(après 3 h. au B.-M. bouillant.

Tubes.....	I	II	III	IV	V	VI
SO^4H^2 p. 100 ..	0,5	4	2	4	5	Acide acétique à 1/2
α au départ... α après action de l'acide..... $l = 2$	$= -24'$ $+10'$	$+16'$	$+19''$	$+21'$	$+21'$	— 18' liquide très limpide pas de précipité
S.R. (p. 100 cm^3)	0 g., 2316	0 g., 2628	0 g., 3006	0 g., 3156	0 g., 3170	25 cm^3 sont évaporés à siccité sous pression réduite, le résidu est repris par 15 cm^3 d'eau : il se forme un précipité blanchâtre ; par ébullition le précipité devient cristallin. On le recueille sur Gooch.
Produit non glucidique...	0 g., 0112	0 g., 0482	0 g., 0534	0 g., 0533	0 g., 0538	le liquide et les eaux de lavage sont complé- tes à 25 cm^3 et filtrés ; le liquide donne $\alpha = -14'$ $(l = 2)$ S. R. (p. 100 cm^3) = 0 g., 1073
Indice.....	408	394	419	421	422	

marie bouillant. La solution se trouble rapidement. Le trouble blanchâtre augmente puis se résoud, en un quart-d'heure, en cristaux incolores qui tombent au fond du tube et dont la quantité augmente peu à peu. Le liquide devient, en une heure, absolument limpide.

Après refroidissement, les cristaux sont recueillis sur un creuset taré et lavés à l'eau jusqu'à élimination totale de l'acide sulfurique. Après dessiccation dans le vide sulfurique, à poids constant, on obtient 0 g.,0958 pour 50 cm³ de solution contenant 0 g.,2372 de stéviolide anhydre, soit une proportion de 40,38 p. 100.

Le liquide acide présente une rotation de $+ 22'$ et contient, pour 100 cm³, 0 g.,3166 de sucre réducteur exprimé en glucose, soit 66,72 p. 100. Si on calcule le pouvoir rotatoire du sucre réducteur formé on trouve $[\alpha]_D = + 57^{\circ},9$.

Un deuxième tube maintenu pendant 4 heures au bain-marie bouillant a donné un liquide ayant aussi une rotation de $\alpha = + 22'$ et contenant pour 100 cm³ 0 g.,3178 de sucre réducteur exprimé en glucose soit 66,97 p. 100 du stéviolide anhydre. Le pouvoir rotatoire calculé pour le sucre est ici $[\alpha]_D = + 57^{\circ},6$.

CHAPITRE VI.

Produits d'hydrolyse acide du stévioside
Son hydrolyse diastasique : produits de
dédoublément obtenus par le suc digestif
d'*Helix Pomatia*.

Nous avons cherché à déterminer quelle était la nature d'une part du produit non glucidique, d'autre part du produit glucidique qui prenaient naissance au cours de l'hydrolyse sulfurique.

1° **Caractérisation du produit glucidique.** — Nos premiers essais ont été effectués sur le liquide acide provenant de l'hydrolyse à $+ 100^{\circ}$ pendant 2 heures de 15 g. de glucoside par SO^+H^2 à 1,5 p. 100. Après neutralisation par le carbonate de baryum, puis concentration sous pression réduite à 200 cm^3 environ, on épuise à plusieurs reprises par l'éther pour enlever la petite quantité de produit non glucidique qui peut rester en solution, puis on évapore à siccité. Le résidu sirupeux, jaune clair, réduit fortement la liqueur de Fehling, le nitrate d'argent ammoniacal, et l'acide picrique en présence de potasse. La réaction des pentoses est négative.

Réaction des hexoses. — 2 à 3 cm^3 d'HCl concentré additionnés de quelques milligrammes d'orcine puis d'une parcelle de résidu sirupeux donnent, par chauffage modéré à $40-50^{\circ}$, une coloration rouge orange,

Cette réaction étant spécifique des hexoses et des méthylpentoses il y avait de fortes présomptions, en raison du fort pouvoir réducteur et du pouvoir rotatoire calculé après hydrolyse, que le produit glucidique soit du glucose.

a) ESSAI D'EXTRACTION DU GLUCOSE. — Nous nous sommes heurté là à de grosses difficultés et finalement, même au bout de plusieurs mois, nous n'avons pu obtenir directement le glucose. L'épuisement de l'extrait par l'alcool à 95° ne fournit aucun résultat.

L'alcool absolu laisse déposer au bout de quelques jours un produit blanchâtre, pulvérulent, formé au microscope de petits cristaux réunis en rosettes, mais qui n'ont aucune ressemblance avec les cristaux de glucose. Le point de fusion est de + 135°, le pouvoir rotatoire de + 47°,1 ; enfin 1 g.,981 de ce corps réduit comme 1.803 de glucose anhydre. Malgré de nombreux essais de purification par recristallisation dans les alcools forts et traitement au noir animal nous n'avons pu obtenir de produit plus nettement cristallisé et dont les propriétés se rapprochent plus de celles du glucose.

b) FORMATION DE MÉTHYLGLUCOSIDE β . — Devant ces résultats négatifs nous avons alors employé l'action synthétisante de l'émulsine en milieu alcoolique.

Le résidu glucidique provenant de l'hydrolyse par SO^4H^2 à 1,5 p. 100 de 1 g. de stéviosidè est épuisé à reflux par 70 cm³ d'alcool méthylique à 70 p. 100 pendant 20'. Sur la solution filtrée on détermine la déviation polarimétrique $a = + 42'$, puis, on dose les sucres : $\text{SR} = 0 \text{ g.,716.}$
($l = 2$)
(p. 100 cm²)

La solution est additionnée de 0 g.,25 d'émulsine et elle est agitée à la roue hydraulique. On suit l'ac-

tion de l'émulsine par des lectures polarimétriques. Nous avons opéré simultanément avec une solution témoin renfermant 1 g.,060 de glucose pour 100 cm³. Au bout de quelques jours déjà, on observe un fort retour de la déviation. La rotation devient bientôt lévogyre. Au bout d'un mois l'action de l'émulsine étant terminée nous avons dosé les sucres dans les 2 liquides

	Liquueur extractive	Témoin
Déviation initiale	+ 42'	+ 1°10,
Déviation finale	— 30'	— 28'
SR (pour 100 cm ³).....	= 0 g.,1757	= 0 g.,191

Dans le témoin il s'est donc combiné 1 g.,060 — 0 g., 191 = 0 g.,869, soit 81,98 p. 100 du glucose.

Dans la liqueur extractive il s'est combiné 0 g.,716 — 0 g.,1757 = 0 g.,540, soit 75,46 p. 100 seulement du sucre réducteur.

L'indice enzymolytique est de 533 dans le témoin et de 450 dans le 2^e liquide. Il faut donc supposer que quelque chose gêne l'action de l'émulsine puisque nous n'avons pas obtenu le même pourcentage de sucre combiné dans les deux essais.

c) EXTRACTION DU MÉTHYLGLUCOSIDE. — Nous avons procédé à l'extraction du méthylglucoside formé dans les essais précédents, mais, la quantité de produit obtenu n'étant pas suffisante pour pouvoir déterminer ses constantes physiques, nous avons fait à nouveau cette extraction sur une solution méthyl-alcoolique de divers résidus glucidiques, après l'avoir soumise à l'action synthétisante de l'émulsine comme précédemment. La liqueur alcoolique filtrée pour la débarrasser de l'émulsine est évaporée à siccité sous pression réduite. Le résidu jaunâtre

dissous dans l'eau distillée, est additionné d'un lait de chaux et, après agitation, d'alcool à 95° en quantité calculée de façon à avoir un titre alcoolique de 80° environ. Le glucose libre, existant dans la liqueur donne du glucosate de Ca insoluble dans l'alcool à 80°, tandis que le glucose combiné à l'alcool méthylique reste en solution dans ce même solvant. Le lendemain, après filtration, on évapore à siccité ; le résidu un peu brunâtre, pèse 9 g. ; on le reprend par 45 cm³ d'alcool à 95° à l'ébullition à reflux. Après addition de noir animal et filtration, la solution très légèrement teintée de jaune et refroidie louchit immédiatement par amorçage avec une trace de méthylglucoside. Il ne tarde pas à se former un dépôt blanchâtre très abondant. Au microscope, on distingue de très nombreuses petites tablettes quadratiques, incolores, à angles dièdres abattus tout à fait semblables à celles obtenues dans le témoin. Après lavage et dessiccation nous avons pesé 4 g.,95 de produit que nous avons identifié au méthylglucoside par ses constantes physiques.

d) IDENTIFICATION DU MÉTHYLGLUCOSIDE β :

1. *Le point de fusion* pris au bloc Maquenne est de + 103°-105°.

2. *Le pouvoir rotatoire* déterminé en solution aqueuse est de $[\alpha]_D = -32^{\circ},11$ ($v = 100$ cm³ $p = 1,9983$ $l = 4$ $a = -2^{\circ},34'$).

3. *Hydrolyse sulfurique* : on a chauffé à l'autoclave à + 110° pendant 2 heures un mélange de 50 cm³ de solution à 1.9983 p. 100 de produit et 50 cm³ de SO⁴H² à 5 p. 100. La liqueur est restée parfaitement limpide.

Au départ la déviation est..... $\alpha_{(l=4)} = -1^{\circ},17'$
 Après 2 heures à $+110^{\circ}$ $\alpha_{(l=4)} = +1^{\circ},30'$

soit un retour de $2^{\circ},47'$ pour un tube de 4 décim.

Le dosage des sucres réducteurs donne 0 g.,830 pour 100 cm³ ; si on calcule l'indice de réduction on trouve 588. L'indice théorique est 574 et celui obtenu par MM. BOURQUELOT et BRIDEL pour leur glucoside synthétique est 577.

4. *Hydrolyse par l'émulsine* : elle a été faite sur 40 cm³ de solution de produit. à 1,9983 p. 100 cm³. On ajoute 0 g.,30 d'émulsine, quelques gouttes de toluène et on met à l'étuve à 27° . La déviation initiale est $[\alpha]_{(l=4)} = -1^{\circ},17'$; quatre jours après elle est de $+1^{\circ},44'$ et il s'est fait 1 g.,756 de sucre réducteur. L'indice enzymolytique est de 582.

5. Enfin nous avons caractérisé les produits de dédoublement du méthylglucoside : alcool méthylique et glucose.

α *Alcool méthylique* : la liqueur provenant de l'hydrolyse acide du produit, neutralisée par le carbonate de chaux, est distillée de façon à recueillir quelques centimètres cubes de liquide. Celui-ci oxydé par le permanganate étendu, en milieu sulfurique, est distillé à nouveau. L'aldéhyde formique formé par oxydation de l'alcool méthylique est caractérisé dans les premières gouttes de distillat par la coloration violette qu'il donne au contact d'une goutte de SO^4H^2 dans laquelle on a projeté quelques cristaux de chlorhydrate de morphine.

β . *Glucose*. — Une partie de la liqueur aqueuse d'hydrolyse, après neutralisation par CO^2Ca est évaporée à siccité au bain-marie, et le résidu repris à l'ébullition par l'alcool absolu. Après filtration en présence de noir

décolorant on obtient un liquide très limpide qui ne tarde pas à cristalliser sur amorce de glucose.

Au microscope ces cristaux forment de petits prismes incolores, plus ou moins agglomérés. Recueillis, lavés et séchés on a déterminé leur pouvoir rotatoire et leur pouvoir réducteur.

$$[\alpha]_D = + 52^{\circ},04 \quad (v = 10 \\ p = 0 \text{ g.}, 1168 \quad l = 2 \quad [\alpha] = + 1^{\circ},13')$$

1 g. de ces cristaux réduisent comme 1,013 de glucose anhydre.

Ainsi, le sucre provenant du dédoublement du stévioside est bien du glucose. Si nous avons eu beaucoup de difficulté à l'obtenir, cela est dû, comme nous le vîmes plus tard, à ce que l'hydrolyse pratiquée avec SO^4H^2 à 1,50 p. 100 pendant deux heures et même trois, n'est pas suffisante. Tant qu'il reste dans le liquide des traces de glucoside inattaqué ou tout au moins partiellement attaqué, très difficile à enlever par les dissolvants, la cristallisation du glucose est impossible. En effet, en poussant l'hydrolyse à fond avec de l'acide sulfurique à 5 p. 100 pendant 3 heures à 100° , il nous fut facile d'obtenir le glucose directement. Un traitement fait dans ces conditions sur 20 g. de stévioside, fournit par épuisement à l'alcool à 95° une abondante cristallisation. Après purification par une nouvelle cristallisation dans ce même solvant on a pesé 6 g.,50 de cristaux purs. Les propriétés physiques et chimiques identifient le produit obtenu avec le glucose. Il cristallise en prismes et présente un pouvoir rotatoire stable de :

$$[\alpha]_D = + 52^{\circ},28 \quad (p = 0 \text{ g.}, 1307 ; v = 10 ; \\ (l = 2 ; \alpha = + 2^{\circ},44')$$

Il possède la mutarotation descendante, le pouvoir rotatoire immédiatement après la dissolution étant de : $[\alpha]_D = + 104^{\circ},56$ ($[\alpha] = + 2^{\circ},44'$). Son ozasone, cristallisée en longues aiguilles jaunes, réunies en pinceaux fond à $+ 232^{\circ}$.

L'indice de réduction enzymolytique obtenu dans la synthèse biochimique et le dosage des sucres permettent de dire que le glucose est le seul sucre présent dans le stévioside.

Produit non glucidique. — Les cristaux qui se déposent au cours de l'hydrolyse acide, constituent le produit non glucidique. Recueillis et lavés jusqu'à élimination totale de SO^+H^2 , on les purifie par cristallisation dans l'alcool à 50° . Ce corps est totalement dépourvu de saveur. Son étude sera faite avec celle du produit non glucidique obtenu par dédoublement diastasique de l'hétéroside.

Hydrolyse fermentaire du stévioside.

1. *Emulsine.* — Nous avons voulu voir si l'émulsine dédouble le stévioside lorsqu'on la fait agir non plus sur l'extractum de la plante comme dans les essais biochimiques, mais sur la solution aqueuse de glucoside pur. Nous avons opéré avec un macéré de 2 g. d'émulsine dans 100 cm^3 d'eau toluénée et une solution assez diluée de stévioside (0 g.,50 p. 100 cm^3) de façon à éviter la précipitation d'hydrate. Après avoir noté la rotation de ces deux solutions, on les mélange à volumes égaux et on met à l'étuve à 30° en même temps qu'un témoin contenant 0 g.,25 de stévioside pour 100 cm^3 . On suit l'action au polarimètre et finale-

ment on dose la matière réductrice dans l'essai et le témoin.

Essai (A)		Témoin (B)
au départ . . .	$[\alpha] = - 52'$ $l = 2$	$[\alpha] = - 12'$ $l = 2$
après 7 jours . .	$[\alpha] = - 46'$	
après 20 jours	$[\alpha] = - 40'$	
après 1 mois.	$[\alpha] = - 36'$	$[\alpha] = - 6'$
après 4 mois.	$[\alpha] = - 32'$	$[\alpha] = - 6'$

SR = 0 g.,0327
(p. 100 cm³)

Dès le lendemain on observe un louche dans A, rien dans le témoin ; peu à peu le liquide de A devient trouble et laisse déposer quelques cristaux blancs. En même temps, dans le témoin, se forment des cristaux en aiguilles ; le dosage du sucre réducteur ne décelle aucune augmentation : le glucoside de la solution a donc précipité en partie, entraînant une diminution de la rotation. Pour A le même phénomène s'est aussi produit ; cependant, le stévioside a subi un très léger commencement d'hydrolyse accusé par une petite augmentation du sucre réducteur ; mais, cette hydrolyse est très faible, même après 4 mois.

Etant donné le peu de solubilité du glucoside dans l'eau, et, sa précipitation même en liqueur très diluée, nous avons essayé le procédé qui a permis à M. BRIDEL de dédoubler par l'émulsine certains glucosides presque insolubles, tel le phloridzосide, et considérés jusque là comme non hydrolysables.

Ayant pulvérisé finement 2 g. de stévioside avec 2 g. d'émulsine nous avons fait une pâte avec un peu d'eau, puis délayé la pâte de façon à obtenir 100 cm³ de liquide. Le mélange a été mis à l'étuve, en présence de toluène et agité 2 fois par jour.

L'émulsion laiteuse conserve à peu près le même aspect. On suit l'action du ferment à l'aide du pola-

rimètre et par dosage des sucres en opérant sur la liqueur déféquée à l'extrait de Saturne et au sulfate de soude. Les résultats ci-dessous sont ramenés au volume du liquide primitif.

Durée de l'expérience	Rotation ($l = 2$)	Sucre réducteur (p. 100 cm ³)
20 jours.....	— 20'	0 g.,039
3 mois.....	— 20'	0 g.,042

L'action de l'émulsine sur le stéviolide est donc nulle.

II. *Essai d'hydrolyse par la rhamnodiastase.* — L'expérience a été conduite exactement comme la précédente en opérant sur 0 g.,50 de glucoside et 0 g.,50 rhamnodiastase.

Au bout de 48 heures, le ferment se sédimente, le liquide surnageant restant homogène. Après 10 jours il se forme deux couches très distinctes : une supérieure, gris foncé, une inférieure très peu colorée, un peu louche. C'est cette dernière que l'on prélève pour les examens et dosages.

Durée de l'expérience	Rotation ($l = 2$)	Sucre réducteur
10 jours.....	$[\alpha] = - 34'$	traces indosables.
70 jours.....	$[\alpha] = - 32'$	

La rhamnodiastase, pas plus que l'émulsine ne double donc le stéviolide.

Un essai d'hydrolyse avec la poudre fermentaire d'*Aspergillus Niger* ne nous donna pas plus de résultat au bout de 20 jours.

III. *Levure basse séchée à l'air.* — Toutes ces expériences restant négatives, nous avons pensé que peut-être nous avions affaire à un glucoside α qui n'était

pas touché par les ferments précédents, mais qui, probablement, serait dédoublé par la glucosidase α . Nous avons alors préparé un autolysat de levure de brasserie suivant les indications de BOURQUELOT ; cette levure basse séchée à l'air étant une source de glucosidase α nous avons fait un macéré aqueux à 1 p. 4. Après avoir pris la déviation $[\alpha] = -1^{\circ},20'$

($l=2$)
de ce macéré, nous l'avons fait agir dans la proportion de 10 p. 100 sur une solution aqueuse de stéviolside à 0 g.,50 p. 100 à l'étuve à 32° . Très vite, il se fait un trouble homogène, puis il se forme au fond du flacon un précipité blanchâtre ne paraissant pas cristallisé, même au microscope. Le liquide surnageant le précipité est encore un peu louche le lendemain, puis se clarifie par la suite, en même temps qu'apparaissent dans la masse du précipité des aiguilles cristallines très longues. Le liquide examiné donne les résultats suivants :

Durée de l'expérience	Déviatoïn ($l=2$)	Sucre réducteur
au départ.....	— $32'$	traces indosables
après 1 jour.....	— $22'$	
après 4 jours.....	— $12'$	
après 15 jours.....	— $4'$	
après 20 jours.....	— $4'$	

Ainsi donc, alors que, d'après les caractères macroscopiques et l'examen polarimétrique de la liqueur d'essai, on pouvait croire à l'hydrolyse du stéviolside, il n'en était rien en réalité ; le précipité qui s'est déposé au fond du flacon provient simplement de l'insolubilisation du glucoside sous forme d'hydrate. La liqueur d'essai précédente agitée avec de l'éther ne lui cède rien (or le produit non glucidique est très soluble dans ce solvant) ; le précipité reste insoluble.

IV. Hydrolyse par le suc digestif d'Escargot [10].

Nous avons essayé de réaliser le dédoublement diastatique du stévioside par un liquide fermentaire, moins spécifique que les ferments précédents, mais dont la puissance diastatique est considérable : le suc digestif de l'*Helix Pomatia*.

Seuls de tous les produits fermentaires que nous avons essayé, le suc digestif et l'hépto-pancréas de l'Escargot sont capables d'hydrolyser le stévioside.

Le suc digestif a été recueilli sensiblement suivant les indications données par GIAJA [16]. Des Escargots de Bourgogne sont débarrassés de leur coquille que l'on brise avec une forte pince jusqu'à la dernière spire. On s'aide d'une sonde cannelée pour couper le muscle columellaire et, mettre ainsi à nu le tube digestif entre le bulbe buccal et l'hépto-pancréas. Rapidement, par compression du tube digestif, on fait écouler le suc dans une éprouvette renfermant un peu de toluène. Ainsi recueilli, ce liquide est pur et exempt de mucus et de sang. Trois douzaines d'Escargots fournissent environ 17 cm³ de suc brunâtre, assez fluide, soit à peu près 0 cm³,5 par animal.

L'hépto-pancréas a été ensuite isolé le plus soigneusement possible et broyé. La bouillie épaisse et noirâtre ainsi obtenue est essayée telle que.

1° **Suc digestif.** — A 100 cm³ d'une solution de stévioside à 0 g.,50 pour 100 cm³, on ajoute 2 cm³ de suc digestif et 2 cm³ de toluène, on met le liquide limpide et jaunâtre à l'étuve à + 32°. Après quelques heures, un trouble commence à se former, et augmente peu à peu. En 2 jours, il se fait un précipité blanchâtre qui se rassemble partiellement à la surface du liquide. Ce précipité est constitué, au microscope,

par un amas de longues aiguilles fines, enchevêtrées. L'examen du liquide a été fait le dixième jour, après défécation par l'extrait de Saturne et le sulfate de sodium. Les résultats ci-dessous ont été ramenés au volume de la solution primitive de stéviolide :

	Rotation ($l=2$)	Sucre réducteur (p. 100 cm ³)
au départ.....	— 22'	0 g.,013
après 10 jours...	+ 15'	0 g.,270

Il s'est donc fait un changement de rotation vers la droite de 37' et 0 g.,257 de sucre réducteur exprimé en glucose, soit un indice de 416, tout à fait voisin de celui que l'on obtient par hydrolyse acide du stéviolide.

L'hydrolyse n'est pas terminée le dixième jour, puisqu'on n'obtient que 0 g.,270 de sucre réducteur, au lieu de 0 g.,317 que fournit l'hydrolyse totale : 85 p. 100 seulement du stéviolide sont hydrolysés.

Un témoin contenant 2 cm³ de suc digestif dissous dans 100 cm³ d'eau toluénée ne présente aucune rotation et ne contient pas de sucre réducteur.

Une autre expérience a été effectuée sur 3 g. de stéviolide qu'on a dissous dans 600 cm³ d'eau contenant 15 cm³ de suc digestif.

Il se forme, en 5 jours, 0 g.,287 de sucre réducteur pour 100 cm³ et cette quantité n'augmente pas. L'hydrolyse n'est pas totale, mais 90,5 p. 100 du stéviolide ont été hydrolysés en 5 jours dans ces conditions.

Il semble donc que l'hydrolyse du stéviolide par le suc d'Escargot se fasse, au début, très rapidement ; elle s'arrête avant d'être complètement terminée, à cause, vraisemblablement d'une altération du fer-

ment, altération qui se manifeste par la formation du précipité tombant au fond du flacon et constitué surtout par des substances non cristallisées.

2° **Hépatopancréas.** — A 100 cm³ de la même solution de stéviolside à 0 g.,50 p. 100 cm³, on ajoute 2 cm³ de la bouillie d'hépatopancréas et 2 cm³ de toluène.

Un témoin est fait avec 2 cm³ de la même bouillie et 100 cm³ d'eau toluénée. Ce liquide, pendant toute la durée de l'expérience, reste très trouble et de coloration verdâtre, avec une légère sédimentation noire.

Dans la solution de stéviolside, il se forme, au contraire, un sédiment abondant, au-dessus d'un liquide brun, légèrement trouble, à la surface duquel nage un précipité grisâtre.

L'examen des liquides, après 11 et 26 jours à l'étuve à + 32°, en effectuant une défécation à l'extrait de Saturne et au sulfate de sodium donne les résultats suivants qui correspondent au volume de la solution primitive de stéviolside :

Durée de l'expérience	Rotation (<i>l</i> = 2)		Sucre réducteur p 100 cm ³	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai
11 jours.....	0	0	0 g.,021	0 g.,199
21 jours.....	0	+ 8'	0 g.,020	0 g.,240

L'hydrolyse du stéviolside par l'hépatopancréas de l'Escargot est donc très nette, puisqu'en 21 jours la rotation passe de — 22' à + 8', soit un changement vers la droite de 30', et qu'il se fait 0 g.,220 de sucre réducteur, exprimé en glucose pour 100 cm³.

L'indice de réduction enzymolytique que l'on calcule, après défécation du pouvoir réducteur du stéviolside (0 g.,013) est de 414, c'est-à-dire, sensiblement

le même que celui obtenu dans l'hydrolyse par le suc digestif (416).

L'hépatopancréas est, toutefois, moins actif que le suc digestif puisqu'il n'a hydrolysé que 69,4 p. 100 du stévioside, en 25 jours, au lieu de 90,5 p. 100, en 5 jours.

Sucre d'hydrolyse diastasique. — Pour extraire le sucre formé par le suc digestif on opère sur le liquide d'hydrolyse de 3 g. de stévioside.

Ce liquide est épuisé à 3 reprises par 150 cm³ d'éther qui dissout le principe non glucidique dont on trouvera la préparation et l'étude plus loin.

Le liquide épuisé à l'éther est clarifié par addition de 15 cm³ d'extrait de Saturne et traitement à l'hydrogène sulfuré. Après essorage du précipité de sulfure de plomb, on obtient un liquide incolore qu'on évapore à sec, sous pression réduite. Le résidu est repris par 100 cm³ d'alcool à 95° bouillant. La solution alcoolique est évaporée à sec et le résidu dissous à l'ébullition, dans 50 cm³ d'alcool à 95°. La cristallisation se fait sur amorce de glucose après addition d'éther. Les cristaux ont été recueillis et purifiés par une nouvelle cristallisation dans l'alcool absolu, en présence de noir décolorant. Les propriétés du produit pur l'identifient, en toute certitude, avec le glucose-*d*.

Au microscope, il se présente sous forme de prismes plus ou moins volumineux, caractéristiques du glucose pur. Il possède une saveur légèrement sucrée, comme le glucose.

Il est doué de la mutarotation descendante. Son pouvoir rotatoire déterminé une heure après est de $[\alpha]_D = + 72^{\circ},9$ ($p = 0$ g., 1029 ; $v = 10$; $l = 2$; $a = + 1^{\circ},30'$)

Son pouvoir rotatoire stable est de $[\alpha]_D = +51^{\circ},83$ ($\alpha = +1^{\circ},4'$).

Le dosage du sucre réducteur effectué par la méthode M. G. BERTRAND, sur la solution ayant servi à déterminer le pouvoir rotatoire, a donné, pour les 10 cm³, 0 g.,1043 de glucose (prise d'essai = 0 g.,1029).

Le sucre réducteur formé dans l'hydrolyse du stéviocide par le suc digestif d'Escargot est donc du glucose-*d*, comme dans l'hydrolyse acide.

Nous allons voir que les produits non glucidiques sont différents.

Produit non glucidique de l'hydrolyse diastasique (stéviol).

Préparation. — La solution étherée provenant de l'épuisement du liquide aqueux d'hydrolyse de 3 g. de stéviocide par le suc digestif d'*Helix Pomatia* est déshydratée par le sulfate de sodium anhydre, filtrée et distillée à sec. Le résidu cristallisé, pèse 1 g.,10. Pour le purifier, on le dissout à l'ébullition dans l'alcool à 50°. Après addition de noir décolorant et filtration, le liquide se prend en une masse de cristaux qu'on recueille, lave à l'alcool à 50° et sèche à l'air. On obtient 0 g.,67. Nous proposons pour ce corps le nom de *stéviol* qui rappelle son origine.

Propriétés. — Le stéviol obtenu par hydrolyse fermentaire, se présente sous la forme d'une poudre légère, incolore, constituée, au microscope, par de fines aiguilles, très longues et enchevêtrées. Il ne possède aucune saveur sucrée.

Il fond instantanément, au bloc MAQUENNE, à + 216°. Au-dessous de cette température et jusque vers + 190°, il se produit une première fusion partielle, laissant un produit blanchâtre qui fond à + 215°. Cette fusion indique que le stéviol doit contenir un dissolvant de cristallisation, eau ou alcool.

En effet, par dessiccation dans le vide, à + 50°-55°, dans l'appareil de BOULLOT, le stéviol perd 9,15 p. 100 de son poids.

L'expérience a été effectuée sur 0 g.,5989 de stéviol séché à l'air et la perte a été de 0 g.,0548. Le stéviol ainsi desséché à poids constant, sans altération, est stable à l'air : il n'augmente pas de poids, même par une exposition prolongée à l'air libre, contrairement au stévioside qui reprend très rapidement de l'eau d'hydratation. Le stéviol ainsi desséché possède un point de fusion instantané, très net, à + 217°, au bloc MAQUENNE.

Le stéviol est actif sur la lumière polarisée, ce qui ne se présente pas fréquemment pour les produits d'hydrolyse non glucidiques des glucosides.

En solution dans l'alcool à 95°, il est fortement lévogyre.

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = - 86^{\circ},50$
($p = 0$ g.,1133 ; $v = 10$; $l = 2$; $a = - 1^{\circ},57$).

Ce qui donne pour le stéviol anhydre, $[\alpha]_D = - 94^{\circ},66$.

Il est très soluble dans les alcools forts et insoluble dans l'eau ; sa solubilité diminue rapidement dans les alcools faibles. Il est très soluble dans l'alcool méthylique, l'éther et l'acétone.

Il donne, avec la solution de soude et de potasse au cinquième, un précipité gélatineux qui ne se dissout pas par dilution dans l'eau.

Il est très soluble dans l'ammoniaque. La solution ammoniacale donne un précipité gélatineux, volumineux, par addition de faibles quantités de solutions de soude ou de potasse.

La solution alcoolique est neutre au tournesol, mais nettement acide à la phénolphthaléine.

En effet, si l'on ajoute à une solution alcoolique, une solution alcoolique diluée de potasse, en présence de phénolphthaléine, on constate qu'on n'obtient la teinte rose qu'après l'addition d'une certaine quantité de la solution alcaline. Le virage étant très net, il est facile de mesurer la quantité d'alcali absorbée par le stéviol.

On dissout 0 g.,1098 de stéviol anhydre dans 15 cm³ d'alcool absolu neutre. Pour obtenir la teinte rose, il faut ajouter 4 cm³,57 de solution alcoolique de potasse à 0 g.,00433 par cm³, ce qui représente 0 g.,01979 de potasse absorbée par 0 g.,1098 de stéviol.

La solution alcoolique ainsi neutralisée ne précipite pas par addition d'eau, alors qu'une solution alcoolique non neutralisée précipite abondamment dans les mêmes conditions. Si on acidifie la dilution aqueuse de la solution alcoolique neutralisée, il se fait immédiatement un précipité cristallisé en aiguilles, ayant tous les caractères du stéviol.

Par évaporation de la solution alcoolique neutralisée, il reste un produit cristallisé, incolore, soluble dans l'eau, qui est la combinaison potassique du stéviol. Sa solution aqueuse donne un précipité gélatineux par addition d'une faible quantité de potasse ou de soude. Pour obtenir la solution aqueuse de la combinaison potassique, il est donc nécessaire de ne pas ajouter un excès d'alcali qui rend le produit insoluble.

Deux classes de composés organiques ont la propriété de former des combinaisons avec les alcalis, ce sont les acides et les phénols. Le stéviol n'est pas un acide, car il est déplacé de sa combinaison potassique par le gaz carbonique. Traitée par un courant de gaz carbonique, la solution aqueuse du stéviol potassé laisse rapidement précipiter le stéviol, cristallisé en aiguilles.

On doit donc considérer le stéviol comme un produit phénolique ou, tout au moins, comme renfermant un oxhydryle possédant de fortes propriétés acides.

Poids moléculaire. — Le poids moléculaire du stéviol est déterminé en utilisant ses propriétés acides, par alcalimétrie.

D'après les résultats précédents : 0 g.,1098 de stéviol anhydre se combinant à 0 g.,01979 de potasse on trouve :

$$P. M = \frac{0,1098 \times 56}{0,01979} = 310,7$$

Analyse élémentaire et composition centésimale. — Chauffé sur une lame de platine le stéviol fond, puis brûle avec une flamme éclairante sans laisser de résidu. Chauffé avec du sodium, il ne donne pas de cyanure : il n'est donc pas azoté et contient uniquement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. L'analyse élémentaire est effectuée sur le stéviol cristallisé dans l'alcool à 50° et séché à poids constant, dans le vide. On opère en tube ouvert, dans un double courant d'oxygène. On obtient les résultats suivants :

1° $p = 0 \text{ g.,1450}$; $H_2O = 0 \text{ g.,1235}$; $CO_2 = 0 \text{ g.,3977}$.

d'où $H = 9,46 \text{ p. 100}$ et $C = 74,80 \text{ p. 100}$.

2° $p = 0 \text{ g.,1009}$; $H_2O = 0 \text{ g.,0873}$; $CO_2 = 0 \text{ g.,2759}$.

d'où $H = 9,68 \text{ p. 100}$ et $C = 75,09 \text{ p. 100}$.

En s'appuyant sur le poids moléculaire trouvé : 310,7 et sur ces résultats, on peut proposer pour le stéviol la formule $C^{20}H^{30}O^3$.

	Calculé pour $C^{20}H^{30}O^3$	Trouvé (en moyenne)
Poids moléculaire.....	318	310,7
C pour 100.....	75,47	74,94
H pour 100.....	9,43	9,57

Nous reviendrons sur cette formule et nous indiquerons la formule du stévioside qui en découle après avoir étudié le principe non glucidique obtenu par hydrolyse acide.

L'isostéviol de l'hydrolyse acide.

Préparation. — Par hydrolyse du stévioside au moyen de l'acide sulfurique à 5 p. 100, à + 100°, il se forme peu à peu un produit blanc, cristallisé, assez dense, qui tombe au fond du ballon. Ce produit est recueilli, lavé à l'eau pour éliminer l'acide sulfurique et séché dans le vide sulfurique. 20 g. de stévioside cristallisé donnent dans une expérience, 7 g.,40 de cristaux blancs, relativement purs. Ces cristaux fondent, sans purification à + 230°, c'est-à-dire à une température nettement supérieure à celle du point de fusion du stéviol pur obtenu par hydrolyse fermentaire, + 217°, ce qui semble indiquer que les deux produits sont différents.

Les cristaux finement pulvérisés, sont purifiés par cristallisation d'abord dans un mélange contenant 850 cm³ d'acide acétique et 1.000 cm³ d'eau, puis dans l'alcool à 55°. On obtient finalement 5 g.,70 de produit pur, séché à l'air.

Dans l'alcool à 70°, ce produit cristallise en très beaux cristaux rappelant ceux du quartz, mais le rendement est mauvais.

Propriétés. — Il possède un aspect tout à fait différent du stéviol obtenu par hydrolyse diastasique. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline, blanche, très dense, inodore et complètement privée de saveur. Au microscope, il est constitué par des cristaux en tablettes losangiques, d'une forme tout à fait caractéristique. Le stéviol de l'hydrolyse fermentaire, cristallisé dans les mêmes conditions, constitue une poudre légère, formée de longues aiguilles.

A cause de cette différence et surtout des différences que nous allons exposer, nous appelons le produit d'hydrolyse acide, *isostéviol*.

L'isostéviol, séché à l'air, ne perd pas de poids à + 50°, dans le vide, dans l'appareil de BOUILLON, alors que le stéviol perd 9,15 p. 100 de son poids. Il est stable à l'air.

Il possède un point de fusion très net et supérieur à celui du stéviol desséché. Il fond instantanément au bloc MAQUENNE à + 234°.

Son pouvoir rotatoire est gauche, mais très nettement différent de celui du stéviol. Déterminé en solution dans l'alcool à 95°, il a été trouvé de :

$$[\alpha]_D = -78^{\circ},24$$

$$(p = 0 \text{ g., } 1278 ; v = 10 ; l = 2 ; ; a = -2^{\circ})$$

Ses solubilités sont, par contre, sensiblement les mêmes que celles du stéviol : il est insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool absolu et l'alcool à 95°, l'alcool méthylique, l'éther, l'acétone. Il est soluble

également dans l'acide acétique dilué, comme on l'a vu précédemment.

Il se comporte avec les alcalis et l'ammoniaque de la même façon que le stéviol.

Il est très soluble dans l'ammoniaque. Son pouvoir rotatoire, en solution ammoniacale, est sensiblement diminué. On a trouvé $[\alpha]_D = -70^{\circ}60$, en dissolvant 0 g.,1133 d'isostéviol dans l'ammoniaque au demi ($v = 10$; $a = -1^{\circ}36$).

La solution ammoniacale donne un précipité gélatineux par addition d'une solution de soude, de potasse ou de baryte.

L'isostéviol ne se dissout pas dans la soude ou la potasse au dixième, même à l'ébullition, et donne un précipité gélatineux.

Sa solution alcoolique et sa solution étherée sont neutres au tournesol.

Sa solution alcoolique est acide à la phtaléine comme celle du stéviol.

0 g.,2028 d'isostéviol sont dissous dans 15 cm³ d'alcool absolu neutre et la solution exige, en présence de phénolphtaléine, 8 cm³,12 de solution alcoolique de potasse à 0 g.,00433 par cm³, soit 0 g.,03516 de potasse.

Si on calcule le poids moléculaire, comme on l'a fait pour le stéviol, on trouve :

$$P. M. = \frac{0,2028 \times 56}{0,03516} = 322$$

c'est-à-dire sensiblement le même que celui du stéviol, 310,7.

La solution alcoolique d'isostéviol précipite abondamment par l'eau avant neutralisation et ne précipite plus après neutralisation par la potasse.

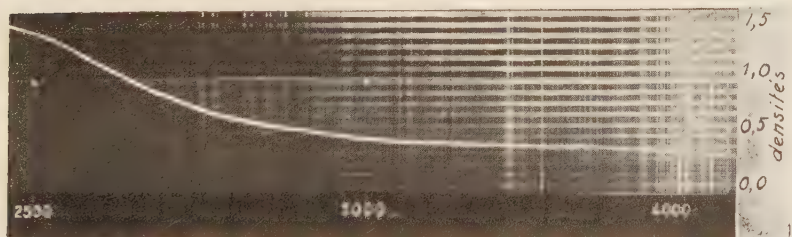
Si l'on acidifie la solution alcoolique neutralisée et diluée dans l'eau, il se forme un précipité cristallisé, en prismes losangiques denses, comme l'isostéviol lui-même.

Par évaporation de la même solution alcoolique neutralisée, on obtient un résidu qui représente la combinaison potassique de l'isostéviol, moins nettement cristallisée que celle du stéviol et moins stable.

Elle se dissout moins facilement dans l'eau et la solution trouble ne tarde pas à laisser précipiter de l'isostéviol à l'état cristallisé ; elle présente alors une réaction alcaline à la phénolphtaléine : il y a donc une dissociation de la combinaison en solution aqueuse.

Le gaz carbonique déplace l'isostéviol de sa combinaison potassique aussi facilement que le stéviol.

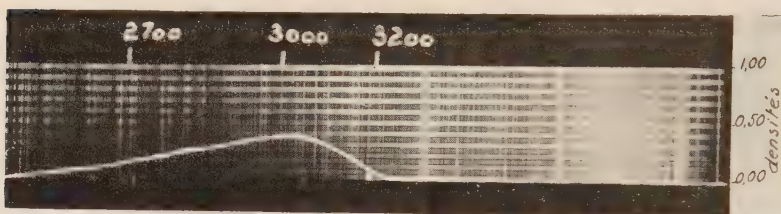
La solution aqueuse précipite de la même façon par addition de soude et de potasse.



Courbe d'absorption du stéviol.

L'isostéviol présente donc un certain nombre de propriétés communes avec le stéviol, mais les deux principes sont nettement différents comme l'indiquent la forme cristalline, le point de fusion, le pouvoir rotatoire.

La courbe d'absorption dans l'ultra-violet (1), déterminée dans les mêmes conditions, sur une solution à 2 p. 100 des deux produits dans l'alcool à 95°, sous une épaisseur de 2 cm., avec un temps de pose de 6 secondes confirme d'ailleurs cette manière de voir : la courbe de l'isostéviol présente un maximum très net à 3050, tandis que la courbe du stéviol ne présente aucun maximum.



Courbe d'absorption de l'isostéviol.

Toutes ces différences ne peuvent provenir que d'une transformation au cours de l'hydrolyse acide. Il est facile, d'ailleurs, de mettre en évidence cette transformation.

Transformation du stéviol en isostéviol. — On dissout une certaine quantité de stéviol dans l'alcool à 95° et on verse dans cette solution une quantité d'acide sulfurique à 5 p. 100 bouillant, telle, que le rapport entre le stéviol et l'acide soit sensiblement le même qu'au cours de l'hydrolyse acide du stévioside. On chauffe un moment à 100° puis on distille à feu

(1) M. le Professeur FABRE a bien voulu se charger de nous déterminer les courbes d'absorption dans l'ultra-violet, je suis heureux de lui adresser ici mes meilleurs remerciements.

nu pour éliminer l'alcool. L'alcool étant éliminé, on fait bouillir à reflux pendant 2 heures après addition d'eau pour ramener au volume primitif.

Au cours de la distillation, quand les deux tiers de l'alcool ont été éliminés, le liquide limpide devient opalescent, puis, après élimination totale de l'alcool, il se fait un précipité très dense. Le précipité est recueilli, lavé et séché. Il est légèrement grisâtre. Il fond à $+ 229^{\circ}$, c'est-à-dire nettement au-dessus du stéviol $+ 217^{\circ}$. Purifié par cristallisation dans l'alcool à 55° , en présence de noir décolorant, il se présente sous l'aspect de l'isostéviol, en prismes losangiques isolés ou mâclés et non plus en longues aiguilles comme le stéviol. Son point de fusion s'est élevé à $+ 229^{\circ} + 233^{\circ}$ qui est le point de fusion de l'isostéviol pur ($+ 234^{\circ}$).

Son pouvoir rotatoire qui était avant le traitement par l'acide sulfurique de $[\alpha]_D = -94^{\circ},66$ s'est abaissé à $-78^{\circ},98$ ($p = 0$ g., 1055 ; $v = 10$; $l = 1$; $a = -50^{\circ}$) celui de l'isostéviol pur étant de $-78^{\circ},24$.

L'acide sulfurique à 5 p. 100 à l'ébullition a donc transformé le stéviol obtenu par l'hydrolyse diastasique en isostéviol obtenu par hydrolyse acide.

Dans l'hydrolyse acide du stévioside, l'action de l'acide sulfurique est donc double : il y a d'abord mise en liberté du stéviol comme dans le dédoublement diastasique et, au fur et à mesure, transformation du stéviol en isostéviol qui est le seul produit non glucidique que l'on trouve à la fin de l'hydrolyse.

Poids moléculaire. — En dehors de la détermination du poids moléculaire effectuée par alcalimétrie et qui a donné un poids de 322, très rapproché du poids moléculaire trouvé pour le stéviol 310,7, nous

avons fait une détermination par cryoscopie qui a donné, d'ailleurs, des résultats moins concordants.

Cette détermination a été faite dans l'acide acétique-pur qui dissout très facilement l'isostéviol ; elle a donné les résultats suivants :

Isostéviol.....	0 g.,4046
Acide acétique.....	20 g.,4067
Isostéviol pour 100 g...	1 g.,9826
Abaissement.....	0°,273
	$39 \times 1,9826$
P. M. =	$\frac{\quad}{0,273} = 283$

Analyse élémentaire. — La composition élémentaire de l'isostéviol est exactement la même que celle du stéviol comme le montrent les résultats ci-dessous. Les analyses ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles du stéviol.

N°	Poids d'isostéviol	H ² O	CO ²	H p. 100	C p. 100
1...	0 g.,1490	0 g.,1262	0 g.,4102	9,41	75,08
2...	0 g.,1420	0 g.,1214	0 g.,3916	9,49	75,21
3...	0 g.,1201	0 g.,1033	0 g.,3316	9,55	75,30

Le tableau suivant résume les résultats obtenus avec le stéviol et l'isostéviol et les chiffres calculés pour la formule proposée C²⁰ H³⁰ O³.

	Calculé pour	Trouvé en moyenne pour :	
	C ²⁰ H ³⁰ O ³	Stéviol	Isostéviol
Poids moléculaire...	318	310,7	322-283
C pour 100.....	75,47	74,94	75,19
H pour 100.....	9,43	9,57	9,48

Ces résultats prouvent que le stéviol et l'isostéviol ont sûrement la même composition élémentaire et que l'acide sulfurique provoque simplement une isomérisation.

Il est difficile, à l'heure actuelle, de se faire une idée de la façon dont peut s'effectuer cette isomérisation dans une molécule aussi complexe en $C^{20}H^{30}O^1$.

La molécule de l'isostéviol se laisse d'ailleurs difficilement attaquer.

Elle ne renferme pas de groupement méthoxylé, la recherche des méthoxy sur 0 g.,2064, suivant la méthode de ZEISEL, ayant donné un résultat négatif.

Elle résiste à l'action de la baryte, à $+ 120^\circ$, pendant 4 heures, en opérant dans les conditions qui permettent, généralement, la scission d'un grand nombre de molécules complexes. Après l'opération, on récupère l'isostéviol à peu près intégralement.

Son oxydation, aussi bien par le permanganate de potassium en milieu ammoniacal pour permettre la dissolution de l'isostéviol que par l'acide chromique, en milieu acétique, est très longue et très difficile. Par l'acide chromique, il a été impossible d'obtenir un produit cristallisé. L'oxydation permanganique a permis d'isoler un corps cristallisé, fondant à $+ 315^\circ$, mais en trop petite quantité pour qu'on puisse l'étudier.

Recherche des groupements fonctionnels. Ces recherches ont été effectuées sur l'isostéviol.

Le produit n'absorbe pas de brome.

1° *Essai de caractérisation d'une fonction cétone* : traité par l'iode en milieu alcalin, on perçoit une légère odeur d'iodoforme, mais jamais nous n'avons pu obtenir ce dernier cristallisé ; de même des essais de formation de phénylhydrazone et d'oxime ne nous ont pas fourni de résultats positifs. Par l'iodomercure de potassium en milieu alcalin (technique de MM. BOUGAULT et GROS [7]) l'isostéviol donne bien

un précipité jaune, mais ceci est dû probablement à l'insolubilisation qui se produit en présence d'un excès d'alcali fort, le précipité formé entraînant un peu de matière colorante de la liqueur.

Il ne paraît donc y avoir de fonction de CO dans la molécule.

2° d'une fonction *phénol* : de même, la présence de la fonction phénol paraît peu probable à cause de l'insolubilité de l'isostéviol et du stéviol dans les alcalis forts, à cause de l'absence de coloration par la potasse et le chloroforme, ainsi que par le perchlorure de fer sur ces produits en suspension aqueuse et en solution dans l'alcool. Seul le réactif de LIEBERMANN, trop général, donne à froid une coloration jaune.

Il y a cependant au moins un groupe OH dans la molécule du stéviol et de l'isostéviol nécessité par la liaison avec le glucose. Peut-être cet oxhydryle est-il alcoolique.

Formation de l'ester acétique de l'iso-stéviol. — On fait bouillir à reflux au bain de sable pendant deux heures 1 g. de stéviol, 1 g. d'acétate de soude fondu et 10 cm³ d'anhydride acétique. Le contenu du ballon est versé dans 200 cm³ d'eau chaude. Au fond du vase se réunissent des gouttelettes huileuses qui se solidifient par refroidissement. Il se dépose en même temps de petites efflorescences blanchâtres qui, au microscope se présentent sous forme de lamelles échan-crées, très souvent accolées les unes aux autres et ayant alors l'aspect de dents de scie.

Purification : le gâteau solidifié au fond du vase est broyé et recueilli ; il est lavé à l'eau distillée et desséché. Broyé finement, on le purifie par dissolution dans l'acide acétique à 1/2 et traitement au noir animal. Après filtration, la solution, par refroidissement, laisse déposer de petits cristaux blanchâtres qu'on recueille, lave avec un peu d'eau et dessèche dans le vide (0 g.,67). Les eau-mères, par addition d'eau distillée, donnent naissance à de nouveaux cristaux.

Ce corps est très soluble dans l'alcool à 95°, beaucoup moins dans les alcools dilués.

Le point de fusion de cet ester au bloc MAQUENNE est très net :

$$P F = + 226^{\circ}$$

La saponification de cet ester est réalisée en faisant bouillir pendant 1 heure 0 g.,5236 de produit en solution dans l'alcool à 90° avec un excès de solution titrée de potasse alcoolique. On titre par retour avec l'acide sulfurique, en présence de phénolphthaléine. Un essai témoin est fait parallèlement.

Supposons que l'estérification ait donné un mono-ester, la saponification libère alors une molécule d'acide acétique qui nécessite une molécule de potasse, mais elle libère aussi une molécule de stéviol qui absorbe de la potasse.

La quantité de potasse nécessaire à la saponification est de 0 g.,15825 ; si on détermine le poids moléculaire de l'ester en se basant sur l'absorption de 2 molécules de potasse, on trouve 370 et le poids moléculaire de l'isostéviol est finalement 328.

Réactions colorées. — 1° Traité par quelques gouttes d'acide sulfurique pur, l'isostéviol se dissout en

donnant une solution incolore devenant en quelques heures, à froid, rose puis rose saumon.

A chaud, avec de l'acide sulfurique au demi, la coloration rose apparaît très rapidement.

2° L'isostéviol en solution chloroformique, (1 cm³) donne par addition de 10 gouttes d'anhydride acétique et 2 à 3 gouttes d'acide sulfurique (réaction de LIEBERMANN) une coloration rose très stable.

3° En solution dans l'alcool à 95° ou dans l'acide acétique, l'isostéviol donne par addition d'un égal volume d'acide sulfurique, une fluorescence jaune verdâtre très nette dont l'intensité augmente pendant plusieurs jours.

Le perchlorure de fer ne donne aucune coloration avec la solution alcoolique.

L'isostéviol ne réduit pas l'azotate d'argent ammoniacal, ni la liqueur cupro-alcaline.

CHAPITRE VII.

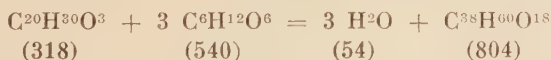
Formule du stéviocide.

Composition élémentaire et centésimale du stéviocide.

Nous avons montré que le stéviol et l'isostéviol ont la même composition élémentaire et le même poids moléculaire. Dans ces conditions on peut déterminer la formule du stéviocide en s'appuyant, d'une part, sur la formule du stéviol et de l'isostéviol, d'autre part, sur le rapport existant, après hydrolyse acide, entre le glucose et l'isostéviol formés.

Nous avons indiqué qu'il se forme, par hydrolyse acide, 66,84 p. 100 de glucose et 40,38 p. 100 d'isostéviol.

Pour obtenir une combinaison glucosidique du stéviol dans laquelle le glucose et le stéviol se trouvent dans ces proportions, il faut, pour une molécule de stéviol, 318, trois molécules de glucose (180×3), avec élimination de trois molécules d'eau, suivant l'équation :



Le stéviocide, chauffé sur une spatule de platine fond, charbonne, puis brûle sans laisser de résidu. La recherche de l'azote est négative.

La composition élémentaire du stéviocide a été

déterminée sur un échantillon pur qu'on a fait recristalliser dans l'alcool méthylique, puis dans l'alcool absolu et enfin, de nouveau dans l'alcool méthylique.

Cet échantillon a été séché soigneusement, à poids constant, à $+ 50^{\circ}$ - 55° , dans l'appareil de BOULLOT, puis abandonné à l'air, à l'abri des poussières, pendant une dizaine de jours, jusqu'à ce qu'il ne présente plus, d'un jour à l'autre que des variations de poids à peu près insensibles. Il avait repris 4,44 p. 100 d'eau dont on a tenu compte dans les calculs.

Les combustions ont été effectuées, en tube ouvert, dans un double courant d'oxygène. Elles ont donné les résultats suivants :

N ^{os}	Poids du stéviocide anhydre en g.	H ₂ O en g.	CO ₂ en g.	H p. 100	C. p. 100
1.....	0,1543	0,1043	0,3204	7,51	56,63
2.....	0,1284	0,0883	0,2651	7,64	56,30
3.....	0,1634	0,1117	0,3379	7,59	56,39

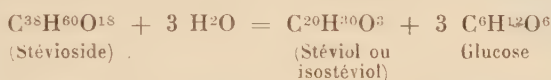
La formule que l'on a déduite de celle du stéviocide et des résultats de l'hydrolyse acide, $C^{88}H^{60}O^{18}$ concorde exactement avec les résultats analytiques, comme le montre le tableau suivant :

	Calculé pour $C^{88}H^{60}O^{18}$	Trouvé (en moyenne)
Poids moléculaire.....	804	»
C pour 100.....	56,71	56,44
H pour 100.....	7,46	7,58
Glucose pour 100.....	67,16	66,84
Stéviol pour 100.....	39,55	40,38

Le poids moléculaire du stéviocide n'a pu être déterminé expérimentalement à cause de sa trop faible solubilité dans l'eau et dans les autres dissolvants

habituellement utilisés pour la cryoscopie. Toutefois, il découle du poids moléculaire du stéviol et du rapport existant entre les proportions de glucose et d'isostéviol trouvées par hydrolyse acide.

A l'examen de ce tableau, on voit que la concordance entre les chiffres théoriques et les chiffres expérimentaux est excellente et qu'elle justifie la formule proposée. L'équation d'hydrolyse du stévioside, aussi bien par les acides que par le suc digestif de l'Escargot est donc la suivante, puisque le stéviol et l'isostéviol ont la même composition :



Le stévioside est donc, d'après cette formule, un hétéroside contenant trois molécules de glucose. C'est à notre connaissance, le premier glucoside, nettement défini, qui possède cette composition. Il représente donc le premier terme d'une nouvelle série de glucosides.

Il était intéressant d'essayer d'en effectuer l'hydrolyse en mettant en liberté le stéviol tout en respectant l'enchaînement des trois molécules de glucose entre elles, comme cela se passe, par exemple dans l'hydrolyse des primevérosides, des robinosides, etc... par la rhamnodiastase.

On devait obtenir ainsi un trihologlucoside auquel, peut-être, était due la saveur fortement sucrée du stévioside.

Essai d'obtention d'un hologlucoside. — Pour provoquer la scission de l'hétéroside en stéviol et glucose tout en respectant l'enchaînement des molécules de cet ose, nous avons d'abord essayé l'action des acides minéraux dilués.

D'après le tableau d'hydrolyse du stéviocide par SO^+H^2 à différentes concentrations (p. 50) et les indices que l'on calcule, c'est l'acide à 1 p. 100 qui paraît le mieux convenir pour provoquer cette coupure : l'indice obtenu après 3 h. de chauffe étant de 394 alors que l'indice final est 422, cela semble indiquer une marche différente du dédoublement. De même en faisant le rapport $\frac{\text{stéviol}}{\text{sucré réducteur}}$ on obtient les chiffres suivants :

SO^+H^2 (p. 100)	0,5	1	2	4	5
Stéviol					
(S R p. 100)	0,166	0,183	0,177	0,168	0,169

Ces observations nous ont poussé à faire une étude systématique d'hydrolyse avec SO^+H^2 à 1 p. 100.

Des tubes scellés (contenant 15 cm³ de solution de stéviocide à 1 p. 100 et 15 cm³ d'acide à 2 p. 100) ont été chauffés au bain-marie bouillant pendant des temps croissants et examinés au bout de ces temps ; nous résumons dans un tableau les résultats obtenus.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Temps de chauffe à 100°	1/2 h.	1 h.	1 h. 1/2	2 h.	2 h. 1/2	3 h.	3 h. 1/2
$\frac{\alpha}{l=2}$	- 6'	+ 2'	+ 8'	+ 12'	+ 13'	+ 16'	+ 18'
S R (g. p. 100 cm ³)	0,1418	0,1923	0,2189	0,2484	0,2500	0,2628	0,2778
isostéviol (r. pour chaque tube)	0,0232	0,0318	0,0406	0,0456	0,0476	0,0482	0,0517
indice	472	443	410	413	405	394	397

D'après l'examen de ces chiffres, on voit que c'est au bout d'une heure de chauffe que l'on doit avoir le plus de chance de se trouver peut-être en présence d'un holo-glucoside.

Des essais d'hydrolyse sur 2 g. de stéviolide ont été faits dans ces conditions. Au bout d'une heure de chauffe, après neutralisation par CO_3Ca et filtration le liquide a été évaporé à sec. On a repris le résidu par trois fois par l'éther acétique pour éliminer le stéviolide. Le résidu glucidique a été dissous dans l'eau distillée. On a dosé les sucres réducteurs puis pris la déviation de la liqueur. On a ajouté de la levure fraîche et laissé fermenter pendant 48 heures. Voici les résultats obtenus :

	α	S R (p. 100 cm^3)
Avant fermentation.....	+ 33'	0 g.,5163
Après fermentation.....	+ 18'	0 g.,0438

Après avoir tué la levure, nous avons évaporé la liqueur à sec sous pression réduite et essayé des extractions par divers solvants. Nous n'avons pu en aucun cas obtenir de produit cristallisé.

Deux autres liquides soumis à l'action de la levure pendant 4 et 5 jours ne contenaient plus au bout de ces temps que des traces indosables de sucres réducteurs et n'avaient plus d'action sur la lumière polarisée.

D'autres essais furent tentés avec le suc digestif d'Escargot. Nous avons opéré sur des solutions de 5 g. d'hétéroside dans 100 cm^3 d'eau, auxquelles on a ajouté 3 cm^3 de suc digestif. Le ferment a été tué dans les divers essais au bout de 15 h., 24 h. et 48 heures. Les liquides déféqués au sous acétate de plomb, puis traités par H_2S ont été évaporés à sec sous pres-

sion réduite. Le résidu a été épuisé par trois fois par 100 cm³ d'éther acétique anhydre, puis par 2 fois avec de l'éther acétique contenant 10 p. 100 d'alcool à 95° (ceci pour se débarrasser du stévioside). Le résidu glucidique repris par l'eau a été additionné de 2 g. de levure fraîche qu'on a laissé agir pendant 48 heures. Voici les résultats constatés :

	α ($l = 2$)	S R (p. 100 cm ³)
Avant fermentation.....	+ 42'	0,839
Après fermentation.....	+ 36'	0,027

Malheureusement l'extraction ne nous a pas encore là fourni de résultat positif.

Rapport entre l'oxhydryle du stéviol et la partie glucidique de la molécule dans le stévioside. — Le glucose, dans le stévioside, est lié au stéviol par l'oxhydryle donnant à la molécule du stéviol des propriétés acides.

En effet, si cet oxhydryle était libre dans le stévioside, cet hétéroside posséderait, comme le stéviol, des propriétés acides.

Nous avons cherché à mettre en évidence ces propriétés en dissolvant le stévioside dans l'alcool absolu neutre et en ajoutant, à la solution, en présence de phénolphthaléine, la même solution alcoolique de potasse utilisée avec le stéviol et l'isostéviol.

Dès la première goutte, le liquide était alcalin : l'oxhydryle actif du stéviol n'est donc pas libre dans le stévioside, il est intéressé dans la liaison glucosidique.

En continuant d'ajouter goutte à goutte la solution alcoolique de potasse, on constate qu'il se forme un précipité. Ce précipité représente une combinaison

potassique du stévioside, mais d'un autre genre que la combinaison du stéviol. Cette combinaison s'effectue grâce aux nombreux oxhydrides alcooliques existant dans les trois molécules de glucose. De telles combinaisons alcalines des sucres, insolubles en milieu alcoolique, sont d'ailleurs bien connues.

TROISIÈME PARTIE.

Sur quelques propriétés physiologiques du stévioside [21].

Cet hétéroside possédant, comme nous l'avons déjà dit, une saveur sucrée environ trois cents fois plus élevée que le sucre de canne, il était intéressant, d'étudier quelles pouvaient être les propriétés *in vivo* et la toxicité d'une telle matière sucrée.

L'origine longtemps confuse du Kaá hê-é et des études botaniques incomplètes, l'avaient fait classer ainsi que nous l'avons vu, dans le genre *Eupatorium* (Composées). C'est à ce genre qu'appartiennent les *Eupatorium cannabinum* et *ageratoides*, desquels ROBERT [19] avait pu extraire des principes de nature saponinique. Cet auteur ayant abordé l'étude de l'*Eupatorium Rebaudianum* en isola des substances qu'il désigna comme Saponines acide et neutre. Cette dernière ayant une saveur sucrée, il l'identifia à l'Eupatorine de DIETERICH et lui trouva un pouvoir hémolytique marqué. A l'appui de son assertion, ROBERT relate les expériences qu'il a faites avec des suspensions au centième de globules rouges de diverses espèces animales dont il a obtenu l'hémolyse

par addition de 1/200^e et même 1/500^e d'eupatorine.

Se basant d'autre part sur les travaux de RASENACK [22] KOBERT identifie l'eupatorine extraite du Kaá hê-é aux saponines, non seulement en raison du pouvoir hémolytique qu'il a trouvé, mais encore en raison de la formule même donnée par RASENACK.

RASENACK attribue à l'eupatorine la formule $C^{42}H^{70}O^{21}$. KOBERT écrit cette formule $C^{42}H^{68}O^{20}$, H^2O . Il la divise par deux et trouve $C^{21}H^{34}O^{10}$ et la fait entrer de cette façon dans la catégorie des produits à formule générale $C^nH^{2n-s}O^{10}$ qui serait, d'après lui, celle de beaucoup de saponines.

Malgré les affirmations de KOBERT, les propriétés aphrogènes et quelques réactions colorées du stévioside, tendant à l'identifier aux saponines, nous avons tenu à vérifier si le stévioside pur que nous avons à notre disposition possédait bien l'action hémolytique que l'on regarde comme spécifique des saponines.

Nos essais ont été conduits de la façon suivante : Des suspensions à 1 p. 100 et 5 p. 100 dans le sérum physiologique de globules de mouton déplasmatisés ont été mises en contact dans des tubes à hémolyse pendant des temps ayant varié de 1/2 heure à 24 heures, à la température du laboratoire, avec des quantités croissantes de solution isotonisée de stévioside à 0 g.,50 p. 100. Les quantités de cette dernière mises en expérience ont varié de 1 à 8 cm³ ce qui représente 5 mg. à 4 cg. de stévioside. Cette expérience répétée un très grand nombre de fois a permis de constater, après centrifugation, l'absence de toute hémolyse, bien que nous ayons atteint la concentration de un pour 322 de stévioside dans le liquide en expérience.

Par contre la même expérience répétée avec un stévioside impur, (jaunâtre et présentant un point de fusion inférieur à celui du stévioside pur) permettait de constater en 45 minutes une hémolyse partielle avec 20 mg. de stévioside pour 7 cm³ de suspension globulaire et presque totale avec 30 mg. La décoction aqueuse de feuilles de Kaá hê-é à 10 p. 100 jouit d'un faible pouvoir hémolytique dès la proportion de 0 cm³,5 pour 5 cm³ de suspension globulaire à 5 p. 100.

Cette expérience explique pourquoi KOBERT a trouvé des propriétés hémolysantes à la fois à l'eupatorine extraite par DIETERICH et au produit préparé par lui-même : une purification insuffisante n'avait pas permis d'éliminer la substance hémolysante existant dans les feuilles.

Définitivement fixés sur ce point, que le stévioside ne saurait être rattaché aux saponines dont il n'a pas la propriété biologique primordiale, nous avons essayé de déterminer sa toxicité et son métabolisme, en procédant par injections sous cutanée au Cobaye, intraveineuse au Lapin et par ingestion chez le Coq. Nos résultats se ramènent aux constatations suivantes : l'injection sous cutanée de 0 g.,06 à 0 g.,12 de stévioside pur par kg. de Cobaye, ne détermine aucun trouble immédiat ni secondaire ; de même l'injection sous cutanée de 1 g.,25 en suspension huileuse chez le même animal dont la survie est assurée sans amaigrissement ni manifestations toxiques d'aucune sorte.

Chez le Lapin l'injection intraveineuse dans la marginale de l'oreille d'une dose de 0 g.,07 et même 0 g.,13 reste sans aucun effet même si on la répète à 24 heures d'intervalle. Avec un Lapin mâle de

3 kg. 300 qui avait déjà reçu en deux injections intra-veineuses, 0 g.,40 de stéviocide en solution aqueuse les 19 et 21 Mai, n'ayant rien enregistré et devant l'impossibilité d'injecter plus de stéviocide par cette voie en raison de sa faible solubilité dans l'eau, nous avons continué l'expérience en injectant par voie sous cutanée à ce même animal 0 g.,45 le 27 mai, 0 g.,62 le 30 Mai et 0 g.,75 le 3 juin. Ce Lapin a reçu au total 2 g.,22 de stéviocide en 15 jours sans présenter d'autre phénomène qu'un amaigrissement de 200 grammes, transitoire du reste, et il a survécu en récupérant son poids. Sacrifié deux mois après il était en parfaite intégrité organique.

Devant l'objection que l'on pouvait nous faire que nous n'arrivions pas à déterminer la dose toxique par kg. d'animal, limités que nous étions à des doses injectables relativement faibles par suite du peu de solubilité du produit dans l'eau (0 g.,50 p. 100 pour une solution extemporanée tiède), nous avons dû recourir à la voie digestive. A cet effet nous avons fait absorber à un Coq de 1 kg.630 sous forme pilulaire, 2 g. de stéviocide le premier jour et 2 g. le lendemain, cet animal s'est montré indifférent à cette absorption et a survécu sans le moindre trouble.

En résumé on voit que le stéviocide aux doses de :

0 g.,10 à 0 g.,12	(Voie sous cutanée par kg. de Cobaye).
0 g.,23	— (Voie sous cutanée par kg. de Lapin).
0 g.,13	— (Voie intra veineuse par kg. de Lapin).
1 g.,25	— (Voie sous cutanée en suspension huileuse par kg. de Cobaye).
2 g.,40	— (par voie digestive en 48 heures par kg. de Coq).

ne se montre pas toxique. Si l'on tient compte de ces chiffres et en admettant que l'homme tolérât par voie

digestive les mêmes quantités que le Coq, il en résulterait qu'un homme du poids moyen de 60 kg. pourrait impunément ingérer en 48 heures 144 grammes de stéviolside, mais il va sans dire que nous donnons les chiffres ci-dessus pour ce qu'ils valent, nous gardant bien de conclure du Lapin et du Coq à l'Homme.

De ce qui précède nous pouvons donc conclure que le stéviolside n'est pas toxique.

Mais quelle peut être sa destinée dans l'organisme ? Constitué par l'union d'une molécule de stéviol et 3 molécules de glucose ou bien il traverserait l'organisme sans être scindé en ses constituants, ce que laisserait prévoir sa résistance non seulement à l'action des ferments essayés au cours de travaux antérieurs, mais encore à celle des acides dilués qui ne l'hydrolysent que lentement ; ou bien il serait hydrolysé avec libération de stéviol et de glucose. L'examen des urines devait probablement nous fournir quelques renseignements. Après injection sous cutanée de 0 g.,75 de stéviolside à un Lapin de 3 kg. 300 nous avons fait les constatations suivantes : 1^{re} miction consécutive à l'injection, volume 60 cm³. Après défécation, l'urine n'a aucune action sur la lumière polarisée et ne renferme que des traces infimes de sucres réducteurs même après hydrolyse sulfurique. Les urines émises dans les 24 heures suivantes atteignent le volume de 370 cm³. Après défécation à l'extrait de Saturne, elles présentent une déviation de — 5' ($l = 2$) et renferment 0 g.,044 de sucre réducteur pour 370 cm³. (L'urine normale du lapin n'avait aucune action sur la lumière polarisée, comme nous nous en sommes assuré et contenait des traces de matières réductrices qui n'augmentaient pas par hydrolyse). Après hydrolyse sul-

furique, la rotation polarimétrique est de $+ 2'$ et la quantité de sucre réducteur s'est élevée à 0 g.,251. Il semble donc résulter que le stévioside passe sans être dédoublé ; de plus, l'élimination par la voie urinaire se montre rapide puisque pour 0 g.,75 de stévioside injecté contenant 0 g.,49 de glucose il nous est possible, après hydrolyse, d'en retrouver, 24 heures après, 0 g.,251, soit une proportion de 50 p. 100.

L'examen des excréments du Coq, effectué après l'ingestion de 4 g. de stévioside, nous a donné des résultats encore plus probants : 50 g. d'excréments recueillis dans les 48 heures consécutives à l'ingestion ont été dilués avec 200 cm³ d'eau. Le mélange a été porté à l'ébullition, filtré et déféqué à l'extrait de Saturne. La liqueur mousse très fortement par agitation ; elle présente une rotation de $- 26'$ ($l = 2$) et renferme 0 g.,070 de sucre réducteur. Hydrolysé par l'acide sulfurique à 8 p. 100 pendant 2 heures au bain-marie bouillant, le liquide laisse précipiter des cristaux blanchâtres identiques à l'isostéviol. Recueillis sur creuset de Gooch, lavés, séchés et pesés, on a obtenu 0 g.,307 d'un produit ayant les propriétés de l'isostéviol. Le liquide acide renferme 0 g.,716 de sucre réducteur ; il s'est donc formé 0 g.,646 de glucose, en même temps que de l'isostéviol.

Ces données analytiques montrent donc que chez le Coq une forte proportion de stévioside traverse les voies digestives sans avoir subi de transformation puisqu'il est possible, après hydrolyse, de retrouver ses produits de dédoublement (glucose et isostéviol).

* * *

Des recherches ci-dessus mentionnées nous estimons devoir conclure que :

1° Le stévioside ne peut être classé dans la catégorie des saponines ;

2° Qu'il n'est pas toxique, ce que laissait prévoir d'ailleurs l'usage que font des feuilles de Kaá hê-é certaines peuplades du Paraguay ;

3° Qu'après injection ou ingestion, il est rapidement éliminé de l'organisme en grande partie sans transformation.

CONCLUSIONS.

I. Le Kaá hê-é, petite plante herbacée originaire du Paraguay, à saveur très sucrée, appartient au genre *Stevia* du groupe des Eupatoriées (Composées). Elle a été décrite par le botaniste BERTONI sous le nom de *Stevia Rebaudiana*. La morphologie interne de la tige et de la feuille est celle du groupe des Eupatoriées. Des poils « d'aspect boudiné » et des poils sécréteurs logés dans les cryptes de l'épiderme inférieur de la feuille semblent caractériser cette espèce.

II. Le *Stevia Rebaudiana* BERTONI renferme un principe possédant une saveur sucrée considérable. Ce principe est un glucoside qui a été extrait pour la première fois à l'état cristallisé par RASENACK, en 1908, puis par DIETERICH, en 1909. L'étude de ce principe que nous appelons le *stévioside* n'ayant été qu'ébauchée par ces auteurs, nous l'avons reprise, et nous avons obtenu les résultats suivants :

Les feuilles de *Stevia Rebaudiana* Bertoni fournissent, par le procédé que nous avons décrit, 60 à 65 g. de stévioside par kg., ce qui est un rendement intéressant. Les tiges renferment beaucoup moins de principe sucré ; nous en avons retiré 3 g.,60 par kg.

Le stévioside pur cristallise en prismes allongés, incolores et constitue une poudre blanche, légère. Il possède une saveur sucrée considérable que l'on peut estimer 300 fois supérieure à celle du sucre.

Ce serait donc le produit naturel le plus sucré que l'on connaisse.

Il fond au bloc Maquenne, instantanément, à $+ 238^{\circ}$ - 239° .

Il se conserve à l'air sans altération, mais il augmente ou diminue de poids suivant l'état hygrométrique de l'air.

Il est lévogyre, $[\alpha]_D = - 31^{\circ},81$ pour le produit anhydre.

Il est soluble dans l'eau, puis la solution se prend en une masse d'aiguilles feutrées, représentant un hydrate à 10,43 p. 100 d'eau, très peu soluble dans l'eau, 0 g.,113 pour 100 cm³, et possédant une saveur moins sucrée que le stéviol.

Le stéviol n'est pas azoté.

Il est hydrolysé par l'acide sulfurique à 5 p. 100, en 3 heures, au bain-marie bouillant en donnant un produit non glucidique cristallisé, insoluble dans l'eau : l'isostéviol, et un sucre réducteur qui a été obtenu cristallisé : le *glucose-d*. Les proportions de ces constituants sont les suivantes :

Glucose.....	66,84 p. 100
Stéviol.....	40,38 p. 100.

Le stéviol qui résiste à l'action hydrolysante de l'émulsine, de la rhamnodiastase, de la poudre d'*Aspergillus niger*, du macéré de levure basse séchée à l'air, est facilement *hydrolysé par le suc digestif de l'Helix Pomatia* et par l'hépatopancreas de cet animal.

L'hydrolyse par le suc digestif est très rapide : en 5 jours, 90,5 p. 100 du stéviol ont été hydrolysés.

Le sucre de l'hydrolyse a été obtenu cristallisé et caractérisé comme *glucose-d*,

Le produit non glucidique, soluble dans l'éther, le stéviol a été obtenu à l'état pur et cristallisé. C'est un principe lévogyre, $[\alpha]_D = -94^{\circ},66$, anhydre, donnant une combinaison potassique soluble dans l'eau, insoluble en présence d'un excès d'alcali et décomposable par le gaz carbonique. Le stéviol n'est donc pas un acide.

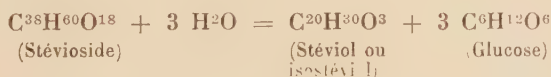
Il répond à la formule $C^{20}H^{30}O^3$.

Par hydrolyse acide, le principe non glucidique diffère du stéviol par la forme des cristaux, un point de fusion plus élevé et un pouvoir rotatoire plus faible. Il possède les mêmes propriétés vis-à-vis des alcalis, et répond à la même formule. C'est l'isostéviol qui se forme par l'action de l'acide sulfurique à 5 p. 100 à l'ébullition, sur le stéviol.

Il est difficile, à l'heure actuelle, de se faire une idée de la façon dont peut s'effectuer cette isomérisation dans une molécule aussi complexe que celle du stéviol en $C^{20}H^{30}O^3$.

En s'appuyant sur cette formule du stéviol et de l'isostéviol et sur les proportions de glucose et d'isostéviol qu'on obtient par hydrolyse acide du stéviolside, on calcule qu'il faut, pour une molécule de stéviol, trois molécules de glucose avec élimination de trois molécules d'eau pour constituer cet hétéroside.

La formule du stéviolside est ainsi $C^{38}H^{60}O^{18}$ et l'équation de son hydrolyse acide ou diastasique totale est :



qui donne 39,55 p. 100 de stéviol ou d'isostéviol et 67,16 p. 100 de glucose, alors qu'on en a trouvé expérimentalement 40,38 p. 100 et 66,84 p. 100.

Le stévioside serait ainsi le premier hétéroside connu formé par l'union d'un principe non glucidique avec trois molécules de glucose-*d*.

Il serait intéressant de trouver un produit fermentaire susceptible d'en effectuer l'hydrolyse en mettant en liberté le stéviol tout en respectant l'enchaînement des molécules de glucose entre elles. Le suc digestif d'Escargot, dans certaines conditions, paraît donner naissance à un ose autre que le glucose ; malheureusement toutes nos tentatives d'extraction de ce produit à l'état cristallisé sont restées infructueuses.

III. Au point de vue physiologique on peut conclure que le stévioside n'est pas une saponine dont il ne possède pas la propriété biologique essentielle : le pouvoir hémolytique, et aussi qu'il n'est pas toxique, même pris à doses très élevées.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

BOUGAULT.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

P. GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE.

1. *Annales de la Droque.* — Octobre 1921, n° 34, 3-6, Paris.
2. BAILLON (H.).— *Dictionnaire de botanique*, 1892, 4, 116, Paris.
3. BAILLON (H.). — *Histoire des plantes*, 1886, 8. 133, Paris.
4. BERTONI (M. S.).— *Revista de Agronomia* de l'Assomption, 1899, 1, 35.
5. BERTONI (M. S.).— Le Kaá hê-é. Sa nature et ses propriétés. *Anales Científicos Paraguayos*, décembre 1905 (1), 1, 1.
6. BEKTONI (M S.). — *Stevia Rebaudiana*; *Estevina y Rebaudina* ; *Las Nuevas Substancias Edulcorantes. Resumen Conclusiones.* *Anales Científicos Paraguayos*, janvier 1918, (2), 2, 129, 134.
7. BOUGAULT (J.) et GROS (R). — Caractérisation des cétones et dosage des aldéhydes par le réactif de Nessler. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922 (7), 26, 5.
8. BOURQUELOT (Em.) et BRIDEL (M).— Recherche et caractérisation du glucose par un procédé biochimique nouveau. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1920 (7), 22, 209.
9. BRIDEL (M.) et LAVIEILLE (R.). — Le principe sucré du Kaá hê-é (*Stevia Rebaudiana* Bertoni). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, 13, 636-655 ; *C. R. Ac. Sc.*, 1931, 192, 1123.
10. BRIDEL (M.) et LAVIEILLE (R.).— Le principe sucré du Kaá hê-é. L'hydrolyse diastasique du stévioside. Le stéviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostéviol de l'hydrolyse acide. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, 13, 781-796 ; *C. R. Ac. Sc.*, 1931, 193, 72.
11. *Bulletin of Miscellaneous Information Royal Botanic Gardens Kew.*, 1918, 343-345

12. *Bull. Soc. Nat. Accl* , 1925, 72^e année, 93.
 13. CAVANILLÈS - *Icones plantarum*, IV, 32, 354-356.
 14. DIETERICH (K.).— Über die Bestandteile der Paraguay-Substoffpflanze *Eupatorium Rebaudianum* Kaá hê-é und ihre pharmaceutische Verwertbarkeit. *Pharm. Zentralh.*, 1909, 50, 435-441, 458-462.
 15. ENGLER et PRANTL. — *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 1891-1894 (4), 4-5, 133.
 16. GIAJA (G.). — Etude des Ferments des Glucosides et des Hydrates de Carbone chez les Mollusques et chez les Crustacés. *Thèse Doct. ès-sciences*, Paris, 1909.
 17. HEMSLEY. — *Hooker's Icones Plantarum*, 1906, 29, tab. 2816.
 18. KOBERT (R.). — Über die pharmakologische Bedeutung und die biologische Wertbestimmung der Sarsaparillen und ihren verwandter Drogen. *Ber d. deutsch. Pharm. Ges.*, 1912, 22, 205-242.
 19. KOBERT (R.). — Über zwei süssschmeckende Drogen. *Ber. d. deutsch. Pharm. Ges.* , 1915, 25, 162-184.
 20. *Nouveaux Remèdes*, 1908, 24, 493.
 21. POMARET (M.) et LAVIEILLE. — Sur quelques propriétés physiologiques du principe sucré du Kaá hê-é. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, 13, 1248-1252.
 22. RASENACK (P.). — Über die Süsstoffe des *Eupatorium Rebaudianum* und des Süssholzes. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*. 1908, 28, 420-443.
 23. REBAUDI (O.). — *Revista de Quimica y Farmacia*, n° 2, 30 octobre 1900 ; n° 3, 15 novembre 1900 ; n° 4, 30 novembre 1900 ; d'après BERTONI (2).
 24. *Résumé Revue internationale des renseignements agricoles*, juillet 1927, 722.
-

TABLE DES MATIÈRES.

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
PREMIÈRE PARTIE. — Etude botanique du <i>Stevia Rebaudiana</i> .	
Morphologie externe de la plante	9
Morphologie interne de la tige et de la feuille	12
DEUXIÈME PARTIE. — Etude chimique du principe sucré du Kaá hê-é.	
CHAPITRE I. — Travaux antérieurs	25
CHAPITRE II. — Caractérisation d'un hétéroside (<i>stévioside</i>) dans les feuilles et dans les tiges	34
CHAPITRE III. — Préparation du stévioside	41
CHAPITRE IV. — Existence d'un seul principe sucré dans le Kaá hê-é	47
CHAPITRE V. — Propriétés physiques et chimiques du stévioside	50
CHAPITRE VI. — Produit glucidique et produits non glucidiques que l'on obtient par hydrolyse acide et par dédoublement diastasique du stévioside	60

CHAPITRE VII. — Composition élémentaire et formule du stéviolside	89
TROISIÈME PARTIE. — Sur quelques propriétés phy- siologiques du stéviolside.....	97
CONCLUSIONS.....	105
BIBLIOGRAPHIE	109
